



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

Maria Carolina Façal Campana

**AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNE DE
INDIVÍDUOS COM TESTE TUBERCULÍNICO POSITIVO OU NEGATIVO
PERANTE ISOLADOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis* SENSÍVEIS E
MULTIDROGA RESISTENTES**

**Vitória
2010**

MARIA CAROLINA FAIÇAL CAMPANA

**AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PARÂMETROS DA RESPOSTA
IMUNE DE INDIVÍDUOS COM TESTE TUBERCULÍNICO
POSITIVO OU NEGATIVO PERANTE ISOLADOS CLÍNICOS DE
M. tuberculosis SENSÍVEIS E MULTIDROGA RESISTENTES**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
Co-orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Vitória
2010

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

C186a Campana, Maria Carolina Faiçal, 1982-
Avaliação dos diferentes parâmetros da resposta imune de indivíduos com teste tuberculínico positivo ou negativo perante isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e multidroga resistentes / Maria Carolina Faiçal Campana. – 2010.
106 f. : il.

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

1. Tuberculose. 2. Teste tuberculínico. 3. Imunidade natural.
4. Resposta imune. I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Palaci, Moisés. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda MARIA CAROLINA FAIÇAL CAMPANA, apresentou dissertação intitulada: "AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS COM TESTE TUBERCULÍNICO POSITIVO OU NEGATIVO PERANTE ISOLADOS CLÍNICOS DE *M. TUBERCULOSIS* SENSÍVEIS E MULTIDROGA RESISTENTES" em sessão pública, no dia 02 de setembro de 2010, 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 as correções apresentadas na dissertação, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a farmacêutica MARIA CAROLINA FAIÇAL CAMPANA, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 28 de outubro de 2010

Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato
(Membro Externo)

Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Membro Interno)

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Orientador)

Prof. Dr. Moises Palaci
(Co-Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Rodrigo Ribeiro Rodrigues, por toda a ajuda e ensinamentos durante este período do mestrado. O meu muito obrigada pela oportunidade e por toda a confiança.

Ao meu co-orientador Moisés Palaci, que gentilmente me cedeu os isolados clínicos utilizados em seu doutorado para a execução desta pesquisa. Muito obrigada.

Ao Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas, meu respeito e admiração por todos os desafios enfrentados para a manutenção deste respeitado centro de pesquisa.

À Angélica Espinosa Miranda, coordenadora da pós-graduação, meu muito obrigada pela preocupação e ajuda para o recebimento da bolsa de mestrado.

Aos meus amigos do Laboratório de TB: João, Leduc, Maria, Solange, Dete, Renata e Cris, que fazem parte desta equipe que já considero um grupo especial de amigos. Agradeço por me ajudarem sempre que necessitei.

Às meninas da sala de esterilização, Rute e Lau, que possibilitaram que meus materiais estivessem sempre prontos para utilização nos experimentos. Obrigada pela atenção dispensada.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia: Carlinha, Valéria, Janete, Raquel, Lorenzo, Flávinha, Lú, Fernanda, Glória, Muriel, Kaymerê e Daniel sempre carinhosos e dispostos a ajudar. Obrigada por toda a colaboração na realização deste trabalho. Um agradecimento especial à Flávia, que foi meu braço direito em todos os experimentos, e também à Lú e Fernanda que com todo o carinho e dedicação, me ajudaram a finalizar este trabalho.

À minha amiga Lúcia Batista que sempre me auxiliou nas questões laboratoriais e pessoais também. Muito obrigada por seus conselhos e observações pertinentes, pela sinceridade e carinho com que sempre me tratou.

Aos amigos da turma do mestrado Thiago, Marco André, Mayra, Thaís, Priscila, Eliana e Aline, obrigada pelo apoio, sorrisos e pela agradável convivência.

A todos os demais amigos do NDI, que contribuíram muito para a realização deste trabalho doando amostras de sangue para a execução dos experimentos. Sem todos vocês esse estudo não seria possível.

A Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação, pelo auxílio nas questões burocráticas.

Aos meus pais José Carlos Campana e Valéria Maria Faiçal Campana, agradeço por tudo que hoje sou. Agradeço ao meu pai, que faleceu no decorrer do mestrado, obrigada por todos os ensinamentos. E à minha mãe, pela demonstração de fortaleza que sempre foi. Amo vocês!

Aos meus irmãos Carlinhos e Vitor, pela torcida e apoio em todos os momentos. A nossa convivência sempre alegre e harmoniosa faz a minha vida muito mais feliz.

Ao meu namorado Carlos Eduardo, que foi meu principal incentivador, obrigada por estar sempre presente. O seu carinho e atenção foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

A Deus, que sempre se mostrou presente em minha vida permitindo que tudo isso acontecesse e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais como estas.

“Os problemas significativos que enfrentamos não podem ser resolvidos no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando os criamos.”

Albert Einstein

RESUMO

A resposta imune contra a tuberculose é mediada por uma resposta do tipo Th1, com a produção de IFN- γ , citocina fundamental para a ativação dos macrófagos e, conseqüentemente para a eliminação do bacilo. Vários fatores podem estar relacionados com a resistência a tuberculose. Neste trabalho, foi avaliado o impacto das células T reguladoras na resposta imune contra o Mtb em infecções de amostras de sangue total e CMSP de indivíduos positivos para o teste com PPD (PPD+) e negativos ao teste com PPD (PPD-). Além disso, avaliamos também se o perfil de resistência dos isolados de Mtb tem relação com o perfil de citocinas secretadas, com a frequência de células T reguladoras e com sua capacidade proliferativa em culturas de sangue total e CMSP dos indivíduos estudados. Para isso, foram arrolados 22 voluntários saudáveis. Desses indivíduos, 11 eram PPD+ e 11 eram PPD-. Foram também utilizados 12 isolados de Mtb, sendo 6 sensíveis e 6 resistentes a drogas anti-tuberculose. Não foram encontradas diferenças entre os perfis de resistência dos isolados de Mtb e os parâmetros avaliados. O número de células T reguladoras encontrado nos indivíduos PPD+ foi maior em relação aos PPD- e a presença dessas células afetou negativamente o efeito microbicida nas culturas de sangue total de indivíduos PPD+, nas quais os isolados de *M. tuberculosis* proliferaram mais. Quando foram feitas infecções com isolados de Mtb em culturas de CMSP nas quais as células T reguladoras foram depletadas uma diminuição na proliferação do Mtb foi encontrada tanto nas amostras de indivíduos PPD+ quanto PPD-. Essa alteração na proliferação do Mtb foi acompanhada de maiores níveis de INF- γ , IL-2, IL-10 e TNF- α em relação às culturas de CMSP na presença das células T reguladoras. Os resultados desse trabalho sugerem que a pré-exposição ao Mtb, evidenciada pelo teste positivo com o PPD, pode aumentar o número de células T reguladoras que, por sua vez, podem prejudicar a resposta imune protetora contra a tuberculose nos indivíduos PPD+.

ABSTRACT

Immunity against tuberculosis depends on the establishment of an effective Th1 response, with IFN- production, a pivotal cytokine to the activation of macrophages and bacilli destruction. It is known that several factors are related to the host's resistance to tuberculosis. In the present work, the influence of T regulatory cells (Tregs) in the immune response against Mtb was evaluated in whole blood and PBMC cultures from tuberculin skin test positive (TST+) and tuberculin skin test negative (TST-) individuals. Paralelly, we also evaluated if different levels of resistance to anti-mycobacterial drugs displayed by different Mtb clinical isolates could interfere with the cytokine profile, Tregs frequency, and with its proliferative capacity on both PBMC and whole blood cultures from TST+ and TST- subjects. Twenty-two healthy volunteers were invited to participate in our study, 11 TST+ and 11 TST-. Twelve Mtb clinical isolates were used, 6 drug-resistant and 6 drug-susceptible. Our data shows that differences in drug susceptibility did not affected any of the evaluated parameters. In the other hand, TST status correlated with differences in Treg frequencies, which was significantly elevated among TST+ when compared to TST- subjects. The increase in Tregs was also associated with a decrease in the microbicidal effect observed in whole blood cultures from TST+, when compared to TST-. This association was confirmed through the depletion of Tregs, which restored the microbicidal activity and an increase in IFN-, IL-2, IL10, and TNF- when compared to undepleted cultures. Data presented here supports the hypothesis that pre-exposure to MTB, represented by a positive TST result, may increase the number of Treg cells, which in turn could affect negatively the establishment of a protective immunity against TB in TST+ individuals.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxas de incidência de tuberculose estimadas em 2008..... 22
- Figura 2.** Micrografia eletrônica do *M. tuberculosis* (quadro à esquerda). O quadro à direita demonstra esquematicamente os principais constituintes da parede celular do gênero *Mycobacterium* 23
- Figura 3.** Ligação entre a resposta imune inata e adquirida. MTB é incorporado pelos fagossomas (P) de APCs por algum dos diversos receptores, o que parece ter inapto na sinalização subsequente. A sinalização dependente dos TLRs é estimulada pela associação dos TLRs com moléculas do patógeno presentes na superfície celular bem como nos fagossomas. Fragmentos antigênicos são processados e apresentados por MHC de classe II para células T que podem então ser ativadas recebendo sinais co-estimuladores apropriados pela ligação dos receptores de células T (CD28 e CTLA-4) com CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) que são expressos pelas APCs. A sinalização normal dos TLR via MyD88 resulta em rápida e potente produção de citocinas tipo Th1, que são essenciais para uma resposta imune inata afetiva e também tem um grande impacto na imunidade adaptativa subsequente pelos seus efeitos na ativação e maturação das células T. Células T e NK ativadas expressam IFN- γ que estimula APCs ativadas a continuarem a produzir citocinas tipo Th1. Porém, na ausência de MyD88 a expressão de citocinas tipo Th1 é comprometida e citocinas tipo Th2 podem predominar. Ag, antígeno; APC, células apresentadoras de antígeno; CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated 4*; IFN- γ , *interferon gamma*; IL, interleucina; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; MHC, *major histocompatibility complex*; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; MyD88, *myeloid differentiation factor 88*; NF- κ B, *nuclear factor kappa-B*; NK, *natural killer*; TGF, *transforming growth factor beta*; TLR, *toll like receptor*; TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*..... 28
- Figura 4.** Mecanismos de supressão da resposta imune pelas células T reguladoras. ADP, *adenosine monophosphate*; ATP, *adenosine triphosphate*; CD, *cluster of differentiation*; CO, monóxido de carbono; CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated 4*; IFN- γ , *interferon-gamma*; IFN- γ R, *interferon-gamma receptor*; IL, interleucina; TGF- β , *transforming growth factor beta*; TGF- β R, *transforming growth factor beta receptor*; Treg, *regulatory T cell*.. 35

Figura 5.	Diluição da suspensão bacteriana para o controle de concentração do inóculo (CCI) e para a infecção. X (volume da suspensão retirada do tubo com diluição 10^{-1} para ser diluído para a infecção da cultura); Y (volume de meio RPMI 1640 completo usado para diluir a suspensão bacteriana para utilizar na cultura); N (concentração de monócitos na amostra do voluntário).....	46
Figura 6.	Seqüência dos procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras ($CD4^{+}CD25^{HIGH}Foxp3^{+}$) por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho <i>versus</i> Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso, os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD4 <i>versus</i> FL2/CD25 utilizado para selecionar a subpopulação celular $CD4^{+}CD25^{HIGH}$ específica em R4. C) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 <i>versus</i> FL2/Foxp3 utilizado para quantificar o percentual de células $Foxp3^{+}$ em R4 ($CD4^{+}CD25^{HIGH}Foxp3^{+}$).....	52
Figura 7.	Modelo de aquisição para leitura das amostras pelo método de CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>) utilizando o Kit <i>Human Th1/Th2 Cytokine</i> , obtido a partir do site bdbiosciences.com/cbatemplates . A região R1 foi ajustada para a seleção da população de interesse, nesse caso a população de beads.....	54
Figura 8.	Perfis genéticos dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> selecionados, definidos pelo método de RFLP IS6110. As letras seguidas de números indicam cada isolado obtido de amostra de pacientes. CR indica a cepa de referência MT 14323	60
Figura 9.	Níveis das citocinas (pg/ml) IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 no sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com isolados sensíveis (S1, S3, S4 e S5), com isolados multidroga resistentes (R1, R3, R4 e R6) e controle não infectado. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina e desvio padrão para cada grupo analisado.....	62
Figura 10.	A) Freqüência de células $CD4^{+} CD25^{high} Foxp3^{+}$ em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- estimuladas com isolados sensíveis (S1, S2, S3, S4, S5 e S6), com isolados multidroga resistentes (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) e com as cepas controle H37Ra e H37Rv nos tempos de 24hs e 72hs. B) Freqüência de células $CD4 CD25 Foxp3$ em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com isolados/cepas de Mtb em 24hs e 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média do percentual de células e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....	64

- Figura 11.** Capacidade microbicida em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD-. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p..... 66
- Figura 12.** Efeito microbicida relativo nas culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com as cepas controle H37Ra, H37Rv e com os isolados S1 e R6. Os resultados estão expressos na forma de razão (média da contagem de UFCs em 4hs/média da contagem de UFCs em 72hs)..... 67
- Figura 13.** Imagem ao microscópio óptico (objetiva 100x) de macrófagos de indivíduos A) PPD+ e B) PPD- contendo bacilos em seu interior. As lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl Neelsen..... 68
- Figura 14.** Avaliação da fagocitose em culturas de macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de amostras de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com os isolados de Mtb S1 e R6 com 2hs e 4hs de estimulação. Os resultados estão expressos em número absoluto de macrófagos contendo bacilos/poço da lâmina e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p..... 69
- Figura 15.** Níveis de óxido nítrico (μM) em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com os isolados S1 ou R6, com as cepas controle H37Ra ou H37Rv e controle não infectado com 72hs de incubação. Os resultados estão expressos em média da concentração de NO (μM) e desvio padrão para cada grupo analisado..... 70
- Figura 16.** Níveis de citocinas em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com os isolados S1 e R6 com 72hs de infecção. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. 71
- Figura 17.** Cinética da capacidade microbicida em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de células Treg com 0h, 4hs e 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média da quantidade relativa de UFCs em porcentagem..... 72

- Figura 18.** Contagem de UFCs em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de células Treg infectadas com os isolados S1 e R6 com 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média da concentração de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p..... 73
- Figura 19.** Efeito microbicida relativo em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de células Treg infectadas com os isolados S1 e R6. Os resultados estão expressos na forma de razão (média da contagem de UFCs em 4hs/média da contagem de UFCs em 72hs)..... 74
- Figura 20.** Níveis de citocinas nas culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de Treg infectadas com os isolados S1 e R6 com 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p..... 75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície 51
- Tabela 2.** Limites teóricos de detecção de citocinas pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*) utilizando o Kit *Human Th1/Th2 Cytokine*..... 53
- Tabela 3.** Informações sobre procedência, subtipo genético e perfil de resistência a drogas anti-tuberculose dos isolados de *M. tuberculosis*..... 59
- Tabela 4.** Dados demográficos dos indivíduos clinicamente saudáveis PPD positivos e dos PPD negativos participantes do estudo. PPD (*purified protein derivative*)..... 61

LISTA DE SIGLAS

AA: Ácido Aracídico

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

APC: Antigen Presenting Cell

BCG: Bacille Calmette-Guérin

CCI: Controle de Concentração do Inóculo

CD: Cluster of Differentiation

COX: Ciclooxygenase

cPLA₂: Phospholipase A₂ Cytosolic

CR3: Complement Receptor 3

CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte-associated 4

DC: Célula Dendrítica

DC-SIGN: Dendritic Cells-specific Intracellular-adhesion-molecule 3 Grabbing Non-integrin

DNA: Deoxyribonucleic Acid

EMB: Etambutol

ESAT-6: Early Secretory Antigenic Target-6 kDa

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

Foxp3: Forkhead Transcription Factor 3

FSC: Forward Scatter

GTP: Guanosina Trifosfato

GITR: Glucocorticoid-Induced TNF-receptor-related Protein

HIV: Human Immunodeficiency Vírus

HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano – locus DR

HSP65: Heat Shock Protein 65

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

IFN- γ : Interferon-gamma

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

INH: Isoniazida

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

LAG-3: Lymphocyte-activation Gene 3

LAM: Lipoarabinomannan
LM: Lipomannan
LO: Lipoxigenase
LT: Leucotrieno
MDP: Muramyl Dipeptide
MDR: Multi-droga Resistente
MHC: Major Histocompatibility Complex
MoDC: Célula Dendrítica Derivada de Monócito
MOI: Multiplicity of Infection
Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*
MyD88: Myeloid Differentiation Factor 88
NF- κ B: Nuclear Factor kappa-B
NK: Natural Killer
NKT: Natural Killer T
NO: Óxido Nítrico
NOD: Nucleotide-binding and Oligomerisation Domain-like Receptor
NR-TB: Nonresistant Tuberculosis
PBS: Phosphate Buffered Saline
PE: Phicoeritrin
PerCP: Peridinin-chlorophyll-protein
PG: Prostaglandina
PIM: Phosphatidyl-myoinositol Mannosidase
PPD: Purified Protein Derivative
PZA: Pirazinamida
RMP: Rifampicina
ROIs: Reative Oxygen Intermediates
RNI: Reative Nitrogen Intermediates
SM: Estreptomicina
SSC: Side Scatter
STF: Soluble Tuberculosis Factor
TB: Tuberculose
TCR: T Cell Receptor
TDM: Trehalose 6,6'-dimycolate
TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

Th: T Helper

TIRAP: TIR Domain-containing Adapter Protein

TLR: Toll Like Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

XDR: Extensively Drug-resistant

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1.	Introdução	20
1.1.	Histórico da Tuberculose.....	21
1.2.	Epidemiologia da Tuberculose.....	22
1.3.	Biologia do Bacilo.....	23
1.4.	Tratamento da Tuberculose.....	24
1.5.	Resposta Imune na Tuberculose.....	25
1.5.1.	Resposta Imune Inata.....	26
1.5.2.	Resposta Imune Adaptativa.....	30
1.6.	Regulação da Resposta Imune na Tuberculose.....	34
1.7.	Resistência x Susceptibilidade.....	36
2.	Objetivos	40
2.1.	Objetivo geral	41
2.2.	Objetivos específicos	41
3.	Material e métodos	43
3.1.	Modelo de estudo	44
3.2.	Seleção dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	44
3.3.	Caracterização dos participantes do estudo	44
3.4.	Avaliação hematológica	45
3.5.	Preparo dos inóculos dos isolados de Mtb.....	45
3.6.	Culturas de sangue total	47
3.7.	Cultura de CMSP na presença e ausência de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺	47
3.7.1.	Depleção de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ por meio de separação magnética ..	48
3.7.1.1	Marcação magnética de células CD4 ⁺	48
3.7.1.2	Depleção das células CD4 ⁺	48
3.7.1.3	Marcação magnética de células CD25 ⁺	49
3.7.1.4	Seleção positiva de células CD25 ⁺	49

3.7.2	Infecção de CMSP.....	49
3.8.	Citometria de fluxo.....	50
3.8.1.	Expressão de marcadores característicos de linfócitos Treg	50
3.8.2.	Detecção e quantificação de citocinas	52
3.9.	Avaliação da capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ e PPD-.....	55
3.10.	Avaliação da atividade fagocitária dos macrófagos em culturas infectadas com isolados de <i>M. tuberculosis</i>	55
3.11.	Dosagem da produção de óxido nítrico.....	56
3.12.	Análise estatística	56
3.13.	Considerações éticas	57
4.	Resultados	58
4.1.	Caracterização dos isolados utilizados no estudo	59
4.2.	Caracterização dos indivíduos estudados.....	61
4.3.	Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de sangue total infectadas com os isolados de <i>M. tuberculosis</i>	61
4.4.	Frequência de células T reguladoras CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ nas culturas de sangue total infectadas com os isolados de <i>M. tuberculosis</i>	63
4.5.	Capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ e PPD- em culturas de sangue total.....	65
4.6.	Atividade fagocitária dos macrófagos em culturas infectadas com isolados de <i>M. tuberculosis</i>	68
4.7.	Dosagem da produção de Óxido Nítrico pelos macrófagos em culturas de sangue total infectadas com isolados de <i>M. tuberculosis</i>	69
4.8.	Dosagem dos níveis de citocinas em culturas de CMSP.....	70
4.9.	Capacidade microbicida de indivíduos PPD+ e PPD- em culturas de CMSP realizadas na presença e ausência de células T reguladoras.....	72
4.10.	Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP realizadas na presença e na ausência de células T reguladoras infectadas com isolados de <i>M. tuberculosis</i>	74

5.	Discussão	76
6.	Conclusões	85
7.	Referências	87

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da Tuberculose

A Europa, com a explosão populacional no segundo milênio D.C. e com o crescimento dos grandes centros urbanos, tornou-se o foco inicial de várias epidemias de TB ocorridas nos séculos XVI e XVII. Essa doença atingiu seu auge na Europa na primeira metade do século XIX, e estima-se que 25% dos europeus morreram devido a TB. Na segunda metade do século XIX, a taxa de mortalidade por TB diminuiu, principalmente devido a melhora na condição sanitária e habitação. Também supõem-se que a seleção natural de indivíduos resistentes a TB pode ter tido um papel importante na diminuição da incidência dessa doença no século XIX, mas a queda foi muito rápida para ser explicada por esses fatores (LIPSITCH and SOUSA, 2002).

Imigrantes europeus levaram a doença para o Mundo Novo, no entanto a taxa de mortalidade nunca chegou aos níveis encontrados anteriormente na Europa. Provavelmente, medidas de saúde pública também tiveram importância na contenção da taxa de mortalidade (SMITH I., 2003).

A morbidade e mortalidade por TB caiu progressivamente durante o século XX nos países em desenvolvimento, devido a melhora nas práticas de saúde pública e o uso generalizado da vacina BCG, bem como pelo desenvolvimento de antibióticos na década de 50. Essa tendência de queda acabou e o número de novos casos começou a aumentar em meados da década de 80. As principais causas para isso foram o aumento de pessoas vivendo nas ruas, a pobreza nos países em desenvolvimento, a emergência de cepas de *Mtb* multidroga resistentes (MDR) e da AIDS, que prejudica a resposta imune mediada por células em indivíduos co-infectados (FRIEDEN et al, 1995).

Ao longo dos séculos, vários pesquisadores descreveram as várias formas de TB e procuraram compreender a origem da doença a fim de melhorar seu diagnóstico, sua prevenção e sua cura. No entanto, somente em 1882, Robert Koch descreveu o agente etiológico da TB *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), ficando também conhecido como bacilo de Koch (KOCH R., 1882).

1.2. Epidemiologia da Tuberculose

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos a tuberculose (TB) ainda é a doença bacteriana que mais mata no mundo, o que a faz um grave problema de saúde pública e seu controle ou erradicação um grande desafio para o século 21. A Organização Mundial de Saúde estima que a TB acometeu 9,27 milhões de pessoas no mundo em 2008. Além disso, mais de 1,5 milhões de óbitos anuais são devido a essa doença (WHO, 2009). A Ásia teve 55% dos casos e a África 31%. As Américas e a Europa tiveram uma pequena fração dos casos. No Brasil, estima-se que o número de casos novos é aproximadamente 92.000/ano, e a taxa de mortalidade está em torno de 8.400/ano (WHO, 2009).

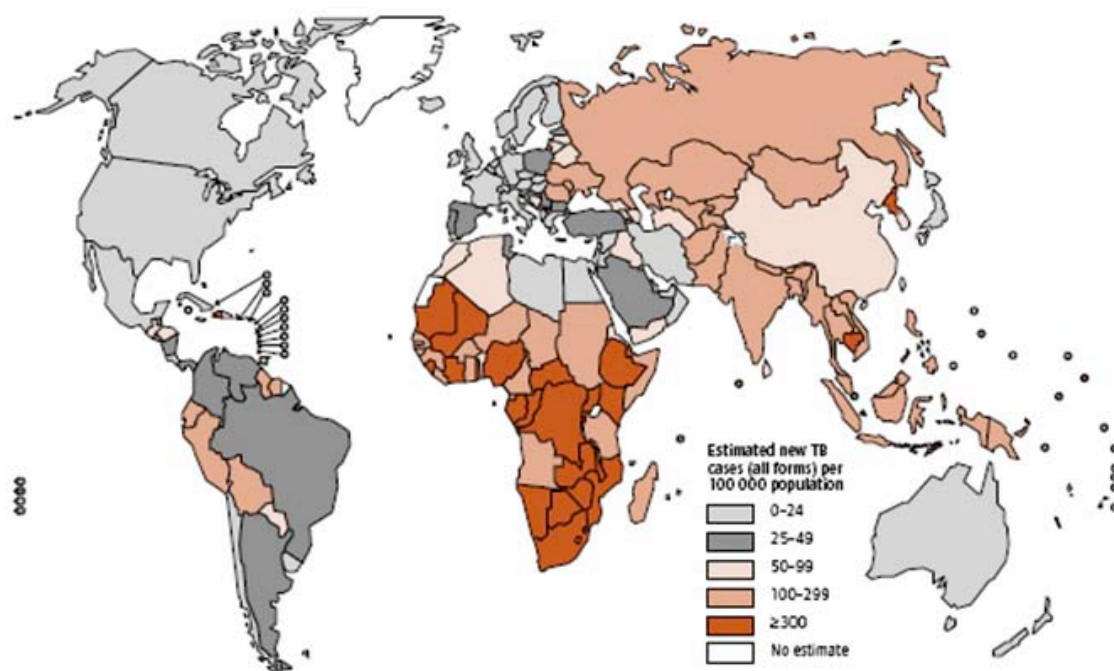


Figura 1. Taxas de incidência de tuberculose estimadas em 2008. (WHO, 2009).

O aumento na incidência de TB, a partir de 1990, tem sido relacionado ao aparecimento da epidemia de AIDS/infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a qual facilitou que pessoas portadoras do bacilo (infecção latente), quando infectadas pelo HIV, ativassem ou re-ativassem a infecção pelo bacilo, vindo a desenvolver a tuberculose (SILVA et al, 2004). Outro fator que contribuiu pra esse aumento do número de casos de TB é a emergência de cepas MDR às drogas normalmente utilizadas no tratamento anti-tuberculose (YOUNG et al, 2008).

Em 2007, foram notificados 511.000 casos de tuberculose MDR (MDR-TB) no mundo. Dentre esses, 289.000 (56,5%) eram novos casos e 221.000 (43,5%) eram

casos que tinham sido previamente tratados para TB. No Brasil, entre os novos casos de TB, 0,9% eram MDR-TB, e entre os casos de TB previamente tratados, 5,4% eram MDR-TB (WHO, 2009).

1.3. Biologia do Bacilo

O Mtb, como as demais micobactérias, é classificado como bacilo álcool-ácido resistente, pois quando coradas com carbol-fucsina não podem ser descoradas com ácido ou álcool. Este fenômeno se deve ao fato de sua parede celular ser rica em lipídeos, os quais contribuem para a resistência da micobactéria a estresses ambientais, como o ressecamento (TORTORA et al, 2000).

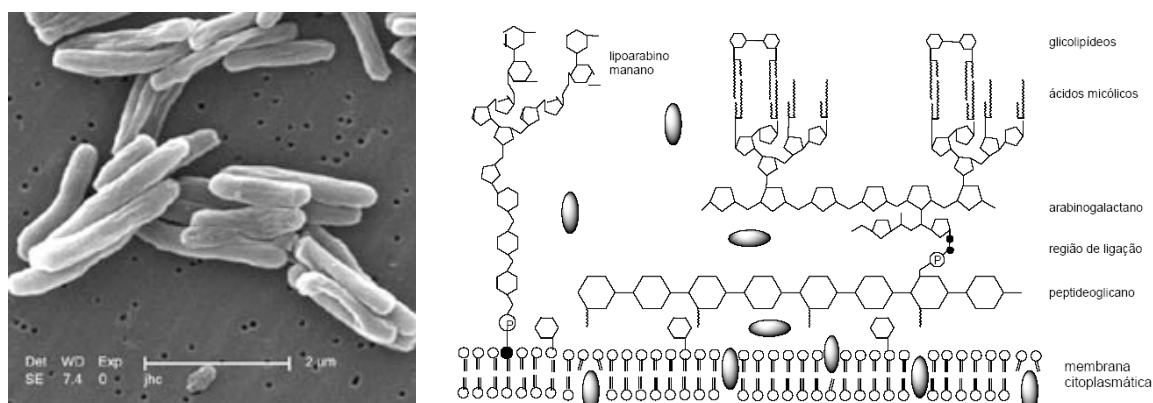


Figura 2. Micrografia eletrônica do *M. tuberculosis* (quadro à esquerda). O quadro à direita demonstra esquematicamente os principais constituintes da parede celular do gênero *Mycobacterium*.

Fonte: www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html

A parede celular e o envelope micobacterianos são estruturas extremamente complexas contendo várias proteínas, lipídeos e carboidratos. Alguns são encontrados somente na micobactéria patogênica, sendo bons alvos para futuras investigações (SMITH I, 2003). Dentre seus componentes podemos destacar alguns como: o lipoarabinomanana (LAM) e o ácido micólico.

O LAM é um glicolípido complexo e é um dos principais componentes da parede celular do Mtb (HUNTER et al, 1986). Essa molécula tem sido descrita como importante imunomodulador, sendo capaz de eliminar radicais intermediários do oxigênio (ROIs) *in vitro* e inibir a proteína quinase C do hospedeiro, e conseqüentemente proteger a micobactéria de mecanismos potencialmente letais, como a explosão respiratória (CHAN et al, 1991).

O ácido micólico também é um componente importante na parede celular do Mtb, tendo vários papéis na patogenicidade micobacteriana. Ele pode atuar inibindo a migração de leucócitos (BLOCH et al, 1950) e também pode estar envolvido na formação do granuloma (KANEDA et al, 1986). O anel ciclopropano, presente na sua molécula, contribui para a integridade estrutural da parede celular (GEORGE et al, 1995) e protege o bacilo do estress oxidativo (YUAN et al, 1995).

Além das que compõem a parede celular, outras moléculas são importantes na determinação da virulência do Mtb. Algumas delas são secretadas pelo bacilo como a ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target -6 kDa*) e a CF-10, que são antígenos reconhecidos no soro da maioria dos pacientes com TB (SKJOT et al, 2000). Uma mutação em ambos os genes que codificam essas proteínas no *M. bovis* resulta em severa atenuação em modelo experimental suíno de infecção, com diminuição da carga bacteriana no baço (WARDS et al, 2000). A enzima KatG (catalase-peroxidase) também é secretada pelo Mtb e exerce função importante na degradação de ROIs e na ativação da pró-droga isoniazida, que atua inibindo a biossíntese do ácido micólico (MARCINKEVICIENE et al, 1995). Portanto, mutações no gene que codifica essa proteína (*katG*) estão relacionadas com a resistência a esse antibiótico, que é um dos utilizados no tratamento da TB (SILVA et al, 2003).

1.4. Tratamento da Tuberculose

A primeira linha de tratamento é composta pelas drogas isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina, enquanto as drogas etionamida, ácido paraaminosalicílico, cicloserina, tiacetona, claritromicina, levofloxacina e amicacina fazem parte da segunda linha de tratamento (WHO; 2009).

O tratamento da TB vem sendo dificultado de forma crescente pela presença de cepas multidroga resistentes (FRIENDEN et al, 1993). A resistência *in vitro* à isoniazida e rifampicina simultaneamente leva à geração de cepas multidroga resistentes segundo o critério internacional (CASTELO et al, 2004). No entanto, no Brasil considera-se multidroga resistente o bacilo que apresenta resistência *in vitro* à isoniazida, rifampicina e a uma terceira droga dos esquemas de tratamento padronizados (CASTELO et al, 2004). A resistência à rifampicina, também utilizada no tratamento da TB, tem sido relacionada a mutações no gene *rpoB* (TELENTI et al, 1997). Recentemente foram observadas inúmeras mutações no gene *pncA* em linhagens de

M. tuberculosis, que podem servir como um indicador de resistência à outra droga anti-tuberculose, a pirazinamida (MORLOCK et al, 2000).

O fenômeno de resistência a drogas anti-tuberculose pode ser classificado em resistência natural, resistência primária e resistência secundária ou adquirida. A resistência primária ocorre quando há a transmissão de cepas resistentes de Mtb de um doente portador de tuberculose resistente para um indivíduo sem história de tratamento para a TB (PABLOS-MENDES et al, 1998). Já a resistência secundária ou adquirida ocorre pela seleção de bacilos resistentes, que pode ser causada por quimioterapia inadequada para tratar bacilos sensíveis; erros na prescrição e falta de medicamentos tuberculostáticos; absorção intestinal deficiente; abandono de tratamento ou falhas em diferentes processos do programa de controle da tuberculose, selecionando-se mutantes resistentes que predominam sobre as populações sensíveis que são eliminadas pela ação dos medicamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ROM and GARAY, 1996).

A resistência apresenta padrões muito distintos entre os países, sendo predominantemente primária nos países desenvolvidos, com aparecimento de surtos localizados em ambientes intra-hospitalares, associada a co-infecção TB/HIV, e aos movimentos migratórios. Já nos países em desenvolvimento que apresentam piores condições sócio-econômicas, padrão endêmico de TB com altas taxas de prevalência associado à infecção pelo HIV, observa-se predomínio da resistência adquirida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; ROSEMBERG et al, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

1.5. Resposta Imune na Tuberculose

Na grande maioria das vezes (85% dos casos) a TB se manifesta como uma doença pulmonar, sendo as vias aéreas superiores a porta de entrada do microorganismo e principal foco da infecção. A história natural da TB sugere que a maioria dos indivíduos é resistente à infecção, provavelmente devido à capacidade de gerarem uma resposta imune eficaz contra o Mtb, a qual é clinicamente comprovada através do teste intradérmico positivo ao PPD (*Purified Protein Derived*), porém essa resposta é incapaz de esterilizar completamente a lesão. Dentre as pessoas expostas à micobactéria, 10-30% se tornam infectadas porém, em apenas 5 a 10% destes indivíduos a infecção progride, transformando-se em TB ativa (NORTH and JUNG, 2004).

1.5.1. Resposta Imune Inata

A TB se estabelece quando partículas de aerossol contendo bacilos viáveis de Mtb são inaladas e chegam aos alvéolos pulmonares do indivíduo. As células fagocíticas exercem um papel fundamental nesse momento da resposta, pois englobam os bacilos para posteriormente direcionar a resposta imune adaptativa através da apresentação de antígenos micobacterianos para as células T, expressão de sinais co-estimuladores e de citocinas (LANZAVECCHIA and SALLUSTO, 2000; HELDWEIN and FENTON, 2002).

Os macrófagos alveolares (MØs) são o primeiro tipo celular envolvido na fagocitose inicial do Mtb. Após esse primeiro encontro, as células dendríticas (DCs) e os macrófagos derivados de monócitos também passam a participar no processo fagocítico (HENDERSON et al, 1997; THURNHER et al, 1997). O reconhecimento e a fagocitose do Mtb envolvem diferentes receptores dos fagócitos, os quais podem se ligar ao Mtb não opsonizado ou reconhecer opsoninas na superfície do Mtb. Após a opsonização com o fator do complemento C3, por exemplo, o bacilo pode ser fagocitado por macrófagos do hospedeiro através do reconhecimento por receptor do complemento 1 (CR1), CR3 e CR4 (ADEREM and UNDERHILL, 1999; HIRSCH et al, 1994).

No entanto, o receptor melhor caracterizado para fagocitose do Mtb não mediada por opsoninas é o receptor de manose (MR), o qual reconhece resíduos manose terminais na micobactéria (SCHLESINGER, 1993; SCHLESINGER et al, 1996). Quando a fagocitose pelos CRs e MR é bloqueada, os MØs também podem internalizar o Mtb pelo receptor *scavenger* tipo A (ZIMMERLI et al, 1996).

Os TLRs (*Toll-like receptors*) também estão envolvidos no reconhecimento micobacteriano em MØs e DCs (MEDZHITOV et al, 1997; VISINTIN et al, 2001). Os receptores da família TLR são proteínas trans-membrana e seu domínio citoplasmático é homólogo ao domínio sinalizador do receptor IL-1 (IL-1R) se ligando à IRAK (quinase associada ao IL-1R), a serina quinase que ativa fatores de transcrição como o NF- κ B que, por sua vez, sinaliza a produção de citocinas pró-inflamatórias (DOHERTY and ARDITI, 2004).

Resultados de estudos *in vitro* indicam que o Mtb é reconhecido por vários TLRs, incluindo TLR-2/1/6, TLR-4 e o TLR-9 (HELDWEIN and FENTON, 2002;

QUESNIAUX, 2004), e demonstram a ocorrência de uma variação na expressão desses receptores em monócitos após infecção ou estimulação com lipídeos de diferentes cepas de Mtb (ROCHA-RAMIREZ et al, 2007). Entre os lipídeos presentes nas micobactérias que podem estar associados à modulação da célula do hospedeiro estão o análogo do fosfatidil inositol trifosfato, o fosfatidil inositol lipoarabinomanana e o lipoarabinomanana (LAM), os quais aparentam contribuir na inibição tanto da maturação do fagossoma quanto do aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático no macrófago após o englobamento da micobactéria (FRATTI et al, 2003).

O receptor TLR-2 trabalha como heterodímero com TLR-1 ou TLR-6 em um complexo com CD36 para reconhecer lipopeptídeos com estruturas distintas e se liga a diversos produtos micobacterianos, incluindo LAM, lipídeos e lipoproteínas (MEANS et al, 1999; BRIGHTBILL et al, 1999; JONES et al, 2001). Uma mutação no gene que codifica o TLR-2 inibe de maneira específica a indução da produção de TNF- α (*Tumoral necrosis factor- α*) pelo Mtb, essa inibição é incompleta, sugerindo que, além do TLR-2, outros TLRs podem estar envolvidos (UNDERHILL et al, 1999).

Em modelos *in vitro* foi demonstrado que o ligante de TLR-4 pode ser um fator termolábil ainda não definido associado ao Mtb (MEANS et al, 1999; MEANS et al, 1999). Já o TLR-9 se liga a dinucleotídeos CpG presentes no DNA bacteriano (KORBEL D.S., 2008).

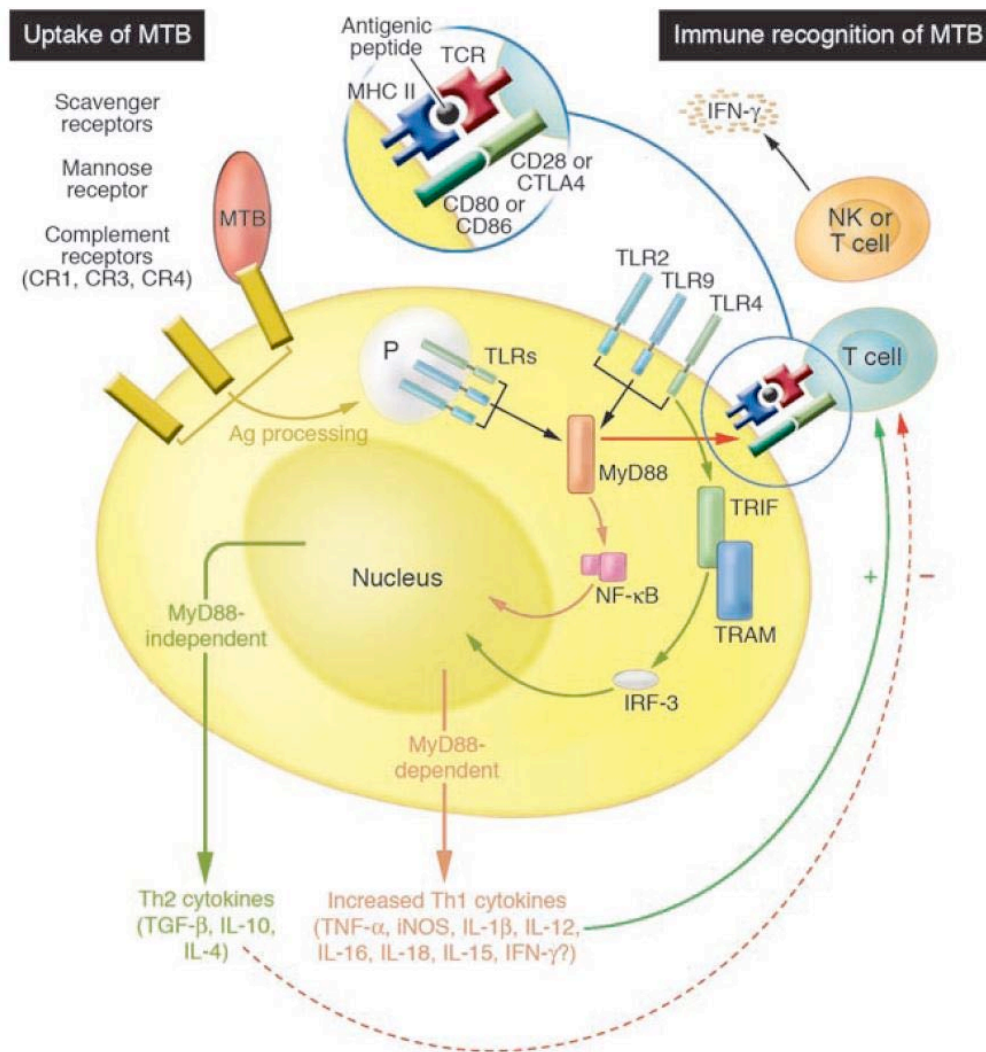


Figura 3. Ligação entre a resposta imune inata e adquirida. MTB é incorporado pelos fagossomas (P) de APCs por algum dos diversos receptores, o que parece ter impacto na sinalização subsequente. A sinalização dependente dos TLRs é estimulada pela associação dos TLRs com moléculas do patógeno presentes na superfície celular bem como nos fagossomas. Fragmentos antigênicos são processados e apresentados por MHC de classe II para células T que podem então ser ativadas recebendo sinais co-estimuladores apropriados pela ligação dos receptores de células T (CD28 e CTLA-4) com CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) que são expressos pelas APCs. A sinalização normal dos TLR via MyD88 resulta em rápida e potente produção de citocinas tipo Th1, que são essenciais para uma resposta imune inata efetiva e também tem um grande impacto na imunidade adaptativa subsequente pelos seus efeitos na ativação e maturação das células T. Células T e NK ativadas expressam IFN- γ que estimula APCs ativadas a continuarem a produzir citocinas tipo Th1. Porém, na ausência de MyD88 a expressão de citocinas tipo Th1 é comprometida e citocinas tipo Th2 podem predominar. Ag, antígeno; APC, células apresentadoras de antígeno; CTLA-4, *cytotoxic T lymphocyte-associated 4*; IFN- γ , *interferon gamma*; IL, interleucina; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; MHC, *major histocompatibility complex*; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; MyD88, *myeloid differentiation factor 88*; NF- κ B, *nuclear factor kappa-B*; NK, *natural killer*; TGF, *transforming growth factor beta*; TLR, *toll like receptor*; TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*. (DOHERTY and ARDITI, 2004).

Após o reconhecimento e fagocitose do Mtb, o MØ precisa ser ativado para matar o bacilo. Produtos de linfócitos, principalmente IFN- γ (*interferon gamma*) (GUTIERREZ et al, 2004; SINGH et al, 2006), e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , são importantes para essa ativação (VALONE et al, 1988). Além disso, a vitamina D parece estar envolvida nesse processo. Essa vitamina induz a expressão de catelicidina (LL37), a qual possui atividade anti-micobacteriana (LIU et al, 2006).

Possíveis mecanismos envolvidos na morte do Mtb nos fagolisossomas de MØs ativados incluem a produção de intermediários reativos do oxigênio (ROIs) (BERRINGTON and HAWN, 2007) ou intermediários reativos do nitrogênio (RNI) (DING et al, 1988; AXELROD et al, 2008). Porém, em alguns experimentos *in vitro*, a micobactéria parece resistente à morte por ROIs, como superóxido e peróxido de hidrogênio (CHAN et al, 1992). Uma possível explicação para isso é o fato de vários produtos micobacterianos, incluindo LAM, serem capazes de eliminar ROIs (CHAN et al, 1991; NEILL and KLEBANOFF, 1988; PABST et al, 1988). O papel dos RNIs na TB permanece incerto. MØs humanos infectados com *M. bovis* BCG *in vitro* provocam aumento do mRNA para iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), e a inibição da iNOS é seguida de maior crescimento bacteriano (NOZAKI et al, 1997).

A apoptose de células fagocíticas pode constituir outro mecanismo efetor do hospedeiro infectado para limitar o crescimento do Mtb (KEANE et al, 1997; PLACIDO et al, 1997). Em um estudo foi observado que a expressão de uma proteína da família da Bcl-2, uma molécula anti-apoptótica, foi induzida pela infecção por Mtb favorecendo a sobrevivência do bacilo em macrófagos infectados (SLY et al, 2003). Portanto, a apoptose pode prevenir a disseminação da infecção e, além disso, reduzir a viabilidade da micobactéria intracelular, enquanto a necrose de células infectadas não (MOLLOY et al, 1994).

Outros tipos celulares também estão envolvidos na resposta ao Mtb. Apesar de seu papel ainda não ter sido esclarecido, os neutrófilos podem contribuir para a morte do bacilo (BORWN et al, 1987; JONES et al, 1990). De maior relevância pode ser a contribuição dos linfócitos T $\gamma\delta$ que, assim como as células NK (*Natural Killer*) possuem atividade citotóxica contra MØs infectados. Seus grânulos contêm granulísina, uma molécula que altera a integridade da membrana micobacteriana e, portanto, mata o Mtb (KAUFMANN S.H., 1999; STENGER et al, 1998). Os linfócitos T $\gamma\delta$ proliferam durante o início da infecção pelo bacilo (HAYDAY and TIGELAAR, 2003), e além de apresentarem atividade citotóxica também estimulam a

atividade microbicida dos MØs ao produzirem a citocina IL-17 (LOCKHART et al, 2006; UMEMURA et al, 2007).

1.5.2. Resposta Imune Adaptativa

As respostas imunes inata e adaptativa estão estritamente relacionadas, e os MØs e DCs exercem um papel crucial no início da resposta imune adaptativa (HELDWEIN and FENTON, 2002). Três processos são necessários para o início dessa resposta: a apresentação do antígeno, a co-estimulação e a produção de citocinas.

A apresentação de antígenos pelos MØs e DCs envolve mecanismos distintos. As moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II apresentam peptídeos micobacterianos para as células T CD4⁺ antígeno-específicas. Esses antígenos devem ser processados no fagolisossoma das células apresentadoras de antígenos (APCs) (NOSS et al, 2001). Já as moléculas de MCH de classe I, expressas em todas as células nucleadas, são capazes de apresentar peptídeos micobacterianos para as células T CD8⁺ antígeno-específicas. Esse mecanismo permite a apresentação de antígenos citosólicos, o que pode ser importante para certos antígenos micobacterianos que podem, de alguma maneira, escapar do fagossoma (MAZZACCARO et al, 1996). A importância da apresentação de antígenos mediada por MCH de classe I tem sido demonstrada em pacientes com TB (CHO et al, 2000; GELUK et al, 2000).

A molécula CD1, também expressa nas APCs, é capaz de apresentar lipoproteínas para células T restritas a CD1. Esse mecanismo de apresentação não permite a ativação de uma grande quantidade de células T nos estágios iniciais da infecção (PORCELLI and MODLIN, 1999). Já foi observado que a expressão de CD1 nos MØs infectados com Mtb diminui, o que pode reduzir a apresentação de antígenos lipídicos do bacilo para as células T (STENGER et al, 1998).

A expressão das moléculas apresentadoras de antígenos é também um processo dinâmico, que é regulado por citocinas. Enquanto citocinas pró-inflamatórias (tipo Th1) estimulam a expressão dessas moléculas, as citocinas anti-inflamatórias (tipo Th2) inibem essa expressão (GERCKEN et al, 1994, PANCHOLI et al, 1993).

A apresentação de antígenos só resulta em estimulação das células T quando acompanhada de sinais co-estimuladores. Os mais bem conhecidos sinais co-estimuladores para células T são induzidos após a ligação das moléculas CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) aos receptores CD28 e CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated 4*)

nos linfócitos, respectivamente (TEIXEIRA et al, 2007). Na ausência dos sinais co-estimuladores, a apresentação de antígenos pode levar ao aumento da apoptose de células T (HIRSCH et al, 2001; HIRSCH et al, 1999).

A produção de citocinas por MØs e DCs também é essencial para a estimulação das células T (OPPMANN et al, 2000). Determinadas citocinas produzidas são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta celular inflamatória do tipo Th1, que contribui para a limitação da infecção pelo Mtb (COOPER et al, 2007). Dentre elas podemos destacar: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.

A secreção de TNF- α por MØs e DCs estimulados com Mtb tem papel importante na formação do granuloma (KINDLER et al, 1989; SENALDI et al, 1996) e na ativação de outros MØs (VALONE et al, 1988). Em pacientes com TB, há produção de TNF- α no local da infecção (BARNES et al, 1993; CASARINI, et al 1999). Foi demonstrado o aumento da susceptibilidade à TB após o bloqueio da ação do TNF- α através do uso de anticorpos monoclonais, como o Infiximabe, para tratamento da artrite reumatóide e doença de Crohn (KEANE et al, 2001).

A segunda citocina pró-inflamatória envolvida na resposta do hospedeiro ao Mtb é a IL-1 β . Em pacientes com TB, essa citocina é produzida no sítio da doença (BERGERON et al, 1997; LAW et al, 1996) e em excesso (SCHAUF et al, 1993). Já a citocina IL-6 possui propriedades pró e anti-inflamatórias (VANHEYNINGEN et al, 1997), sendo produzida precocemente no local da infecção micobacteriana (HOHEISEL et al, 1998; LAW et al, 1996). A IL-6 pode ser prejudicial na TB, inibindo a produção de TNF- α e IL-1 β (SCHINDLER et al, 1990). Outros trabalhos mostram o papel protetor da IL-6: camundongos deficientes na produção de IL-6 apresentam aumento na susceptibilidade a infecções com Mtb (LADEL et al, 1997), que parece estar relacionada com deficiência na produção precoce de IFN- γ na infecção (SAUNDERS et al, 2000).

A IL-12 é uma citocina que exerce papel fundamental na defesa do hospedeiro contra o Mtb, sendo essencial para a indução da produção de IFN- γ (O'NEILL and GREENE, 1998). Na TB, a IL-12 tem sido detectada nos infiltrados pulmonares (CASARINI, et al 1999; TAHA et al, 1997) e nos granulomas (BERGERON et al, 1997). A expressão de receptores para IL-12 também aumenta no local da infecção (ZHANG et al, 1999). A utilização de anticorpos anti-IL-12 leva a uma diminuição na produção de IFN- γ *in vitro*, e à indução da produção de citocinas do tipo Th2 (SALGAME P., 2005).

Dentre as citocinas do tipo Th2, que estão envolvidas com a progressão da TB, a de maior destaque é a IL-4 (LIENHARDT et al, 2002; SEAH et al, 2000; SEAH and ROOK, 2001). Os efeitos dessa citocina parecem estar relacionados com a supressão da produção de IFN- γ (LUCHEY et al, 1996; POWRIE and COFFMAN, 1993) e da ativação de MØs (APPELBERG et al, 1992). Vários estudos têm demonstrado aumento na produção de IL-4 em pacientes com TB, especialmente com doença cavitária (SANCHEZ et al, 1994; SURCEL et al, 1994; van CREVEL et al, 2000).

Outra citocina que parece ser importante na resposta ao Mtb é a IL-17, que é conhecida como uma citocina inflamatória capaz de induzir gradientes de quimiocinas, estimular a atividade microbicida dos MØs e iniciar o processo inflamatório, principalmente no pulmão (SERGEJEVA et al, 2005; KOLLS and LIDEN, 2004; MIYAMOTO et al, 2003; KAUFMANN SH, 1999). Por ser responsável pela persistência e função das células produtoras de IL-17 (Th17), a IL-23 também exerce um papel chave na inflamação (STOCKINGER and VELDHOEN, 2007). Na ausência de IL-17 ou IL-23 as conseqüências da infecção por Mtb são pequenas (KHADER et al, 2005).

Existem também citocinas que atuam regulando a resposta imune ao Mtb. Dentre elas temos: IL-10 e TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*). A IL-10 é produzida tanto por macrófagos após a fagocitose do Mtb (SHAW et al, 2000), como por linfócitos T (BOUSSIOTIS et al, 2000; GEROSA et al, 1999). Essa citocina age diminuindo a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (GONG et al, 1996; HIRSCH et al, 1999). Um estudo demonstrou que na TB, a produção de IL-10 foi maior em pacientes anérgicos, tanto antes como após o tratamento com sucesso, sugerindo que a produção de IL-10 induzida pelo Mtb suprime a resposta imune eficaz (BOUSSIOTIS et al, 2000).

O TGF- β também atua prejudicando a resposta imune protetora na TB. Essa citocina suprime a imunidade mediada por células: nas células T, TGF- β inibe a proliferação e a produção de IFN- γ ; nos macrófagos, antagoniza a apresentação antigênica, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação celular (TOOSSI and ELLNER, 1998). Como ocorre com a IL-10, o TGF- β é produzido em excesso durante a TB e é encontrado no local da infecção (TOOSSI et al, 1995).

Realizada a apresentação do antígeno, a co-estimulação e a produção de citocinas pelas APCs, as células T virgens são ativadas levando ao desenvolvimento de uma resposta imune adquirida. Essa resposta é marcada pela produção de IFN- γ por essas células (ANDERSEN P. 1997). O IFN- γ é a principal molécula ativadora de

macrófagos. Alguns estudos demonstraram que os níveis de IFN- γ estão diminuídos em pacientes com TB ativa (HIRSCH et al, 1999), e que estes níveis estão ainda mais diminuídos em pacientes com doença pulmonar avançada e em pacientes com TB co-infectados por helmintos intestinais (RESENDE CÓ et al, 2007). Além disso, foi demonstrado que o *M. tuberculosis* pode impedir que macrófagos respondam adequadamente ao IFN- γ (TING et al, 1999).

As células T CD4⁺ são as principais na resposta contra o Mtb, exercendo sua função protetora através da produção de IFN- γ principalmente (NORTH and JUNG, 2004). Camundongos deficientes para o MHC de classe II, impossibilitando que as células T CD4⁺ desempenhem seu papel, são susceptíveis à infecção por Mtb (CARUSO et al, 1999).

Evidências indicam que as células T CD8⁺ citotóxicas produtoras de IFN- γ contribuem para a resistência à infecção micobacteriana (SOUSA et al, 2000; FLYNN et al, 1992). Tem sido sugerido que essas células, ao liberarem perforina e granulicina, atuam na proteção contra o Mtb por meio de citólise (STENGER et al, 1999). Apesar do principal mecanismo para a defesa do hospedeiro para destruir o Mtb intracelular incluir a ativação de MØs mediada por células Th1 CD4⁺, a morte de células infectadas mediada por células T CD8⁺ citotóxicas também é importante, especialmente na fase tardia da infecção (GROTZKE and LEWINSOHN, 2005).

A estrutura central da resposta imune para limitação da infecção pelo Mtb é o granuloma, que é uma organização celular que contém o bacilo viável (COSMA et al, 2003; FLYNN and CHAN, 2005; SAUNDERS and BRITTON, 2007). O granuloma é composto de uma agregação de macrófagos contendo o Mtb circundado por linfócitos, incluindo as células T CD4⁺ e CD8⁺. Algumas dessas células T reconhecem antígenos de Mtb e produzem citocinas efetoras, como IFN- γ e TNF- α , promovendo a ativação dos macrófagos e controlando o crescimento micobacteriano (EHLERS S, 1999). O granuloma auxilia na contenção do Mtb e limita a extensão da inflamação e o dano tecidual do hospedeiro (SAUNDERS and COOPER, 2000). Por outro lado, ele também contribui para a sobrevivência do bacilo proporcionando um local propício para sobrevivência prolongada (KAUFMANN SH, 2005).

O papel dos linfócitos B na TB ainda não está esclarecido. Classicamente, as células B e os anticorpos produzidos por elas não têm contribuição significativa na proteção contra o Mtb (KUMARARATNE DS, 1997). Diversos estudos em humanos (CASANOVA and ABEL, 2002; DOFFINGER et al, 2005) e em camundongos

(JOHNSON et al, 1997; TURNER et al, 2001) imunodeficientes para linfócitos B buscaram demonstrar se essas células conferem efeito protetor na infecção pelo bacilo, porém ainda não é possível determinar uma função clara para essa subpopulação na resposta imune durante a TB.

1.6. Regulação da Resposta Imune na Tuberculose

Outra população celular que influencia a resposta ao Mtb é a de células T reguladoras (Treg) (CHEN et al, 2007; GUYOT-REVOL et al, 2006; LI and WU, 2008; RIBEIRO-RODRIGUES et al, 2006). Diversos marcadores têm sido encontrados em células com ação reguladora, dentre eles temos: CD25, CD103, CD62L, CD45RB, GITR (*glucocorticoid induced TNF-like receptor*), CTLA-4, CD127 (BANHAM AH, 2006), OX40 (SHEVACH et al, 2006), receptor 4 de folato (YAMAGUCHI et al, 2007), neuropilina-1 (BRUDER et al, 2004), LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*) (HUANG et al, 2004), CD39 e CD73 (DEAGLIO et al, 2007), sendo impossível a identificação de uma única subpopulação. Essa identificação é ainda mais difícil devido ao fato desses marcadores não serem exclusivos das células T reguladoras.

Por essa razão várias subpopulações dessas células, incluindo células Treg naturais ($CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$), Th3 e Tr1 foram identificadas e mostraram ter um papel importante na modulação das respostas imunes inflamatórias (WING et al, 2006). Subpopulações de células T $CD8^+$ também têm demonstrado ter papel supressor por meio de contato celular e via receptores ILT3 (*Immunoglobulin-like transcript 3*) e ILT4 (*Immunoglobulin-like transcript 4*) (CHANG et al, 2002).

As células Treg naturais, que são as mais bem descritas na literatura, podem ser originadas de duas fontes: células T imaturas comprometidas com essa linhagem no timo, e células T maduras recrutadas para a população reguladora na periferia, sendo conhecidas como Treg induzidas (BLUESTONE and ABBAS, 2003; KRETSCHMER et al, 2005; APOSTOLOU and von BOEHMER, 2004). No timo, as células Treg podem ser selecionadas a partir de timócitos imaturos na região do córtex, ou se diferenciar a partir de timócitos mais maduros $CD8^-CD4^+$ na região medular do timo (JORDAN et al, 2001; BESINGER et al, 2001; FONTENOT et al, 2005). Na periferia, as células Treg podem se diferenciar a partir de células virgens ou efetoras após ativação por auto-antígenos teciduais ou antígenos exógenos (SEDDON and MASON, 1999; APOSTOLOU and von BOEHMER, 2004).

Existem diferentes mecanismos de ação para as células T reguladoras, sendo 4 principais: secreção de citocinas inibidoras, citólise, distúrbio metabólico e supressão por contato celular.

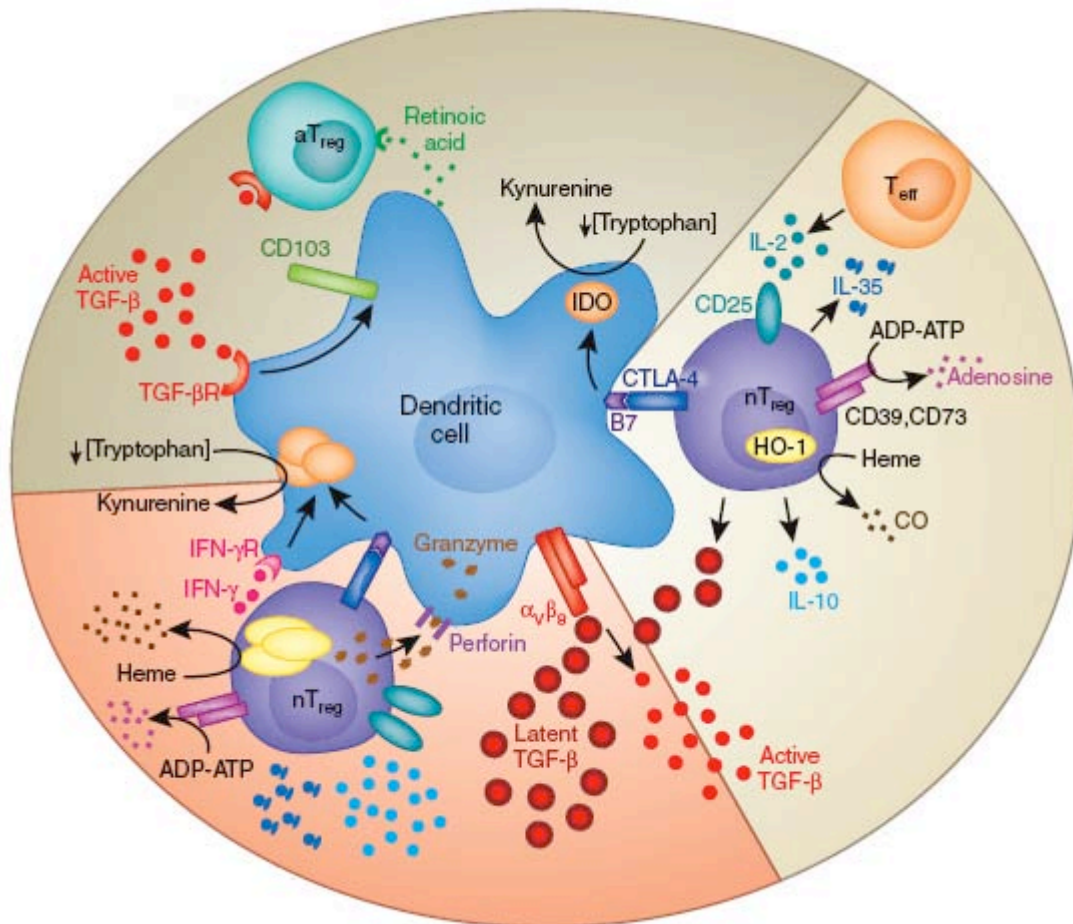


Figura 4. Mecanismos de supressão da resposta imune pelas células T reguladoras. ADP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; CD, cluster of differentiation; CO, carbom monoxide; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte-associated 4; IFN- γ , interferon-gamma; IFN- γ R, interferon-gamma receptor; IL, interleucina; TGF- β , transforming growth factor beta; TGF- β R, transforming growth factor beta receptor; Treg, regulatory T cell. (adaptado de Tang Q and Bluestone J.A., 2008).

A secreção de citocinas inibidoras se dá com liberação de IL-10 e TGF- β , principalmente (ASSEMAN et al, 1999; MANN et al, 2007; SCHUMACHER et al, 2007; FAHLEN et al, 2005). Já a supressão por citólise é realizada pelo efeito da liberação de moléculas citotóxicas, como a perforina e granzima A (GROSSMAN et al, 2004). No distúrbio metabólico há consumo local de IL-2 devido à alta expressão de CD25, que é um receptor para IL-2, por essas células impedindo que as células T efetoras adjacentes tenham acesso a essa citocina (PANDIYAN et al, 2007). A supressão mediada por contato celular resulta da interação de CTLA-4 com CD80/86

de DCs, induzindo a produção de IDO (indometacina 2,3-dioxigenase), que leva à degradação de triptofano e produção de metabólitos pró-apoptóticos nestas células (GROHMANN et al, 2003).

No que se refere à TB, diferentes estudos descreveram que o aumento na frequência de células $CD4^+CD25^+$ ou $CD4^+Foxp3^+$ foi inversamente proporcional à produção de $IFN-\gamma$ em pacientes com TB (CHEN et al, 2007; GUYOT-REVOL et al, 2006; LI and WU, 2008; RIBEIRO-RODRIGUES et al, 2006). Recentemente nosso grupo demonstrou que o número de células circulantes com fenótipo $CD4^+CD25^{high}$ em pacientes portadores de tuberculose era 3 vezes maior do que o observado em indivíduos saudáveis. Além disso, para avaliar a participação das células reguladoras na modulação da resposta imune, analisamos a produção de $IFN-\gamma$ em cultura na presença e na ausência de células reguladoras. Foi observado que, com a depleção das células reguladoras, a produção de $IFN-\gamma$ pelas células mononucleares de sangue periférico era aumentada (RIBEIRO-RODRIGUES et al, 2006).

Portanto, o equilíbrio entre células T efetoras e T reguladoras durante a infecção parece contribuir tanto para a sobrevivência do hospedeiro, impedindo um dano tecidual exacerbado, como para a sobrevivência do agente infeccioso, regulando o sistema imune que age contra o patógeno. Dessa forma, as células T reguladoras passam a representar mais um fator na complexidade das interações entre patógenos e hospedeiros.

1.7. Resistência x Susceptibilidade

Ainda não se sabe a causa pela qual alguns indivíduos são mais susceptíveis à TB do que outros. A busca por fatores que diferenciem esses dois grupos é importante no esclarecimento dos mecanismos efetores dessa resposta e para uma prevenção mais eficaz. De fato, o desenvolvimento da TB é determinado por fatores associados tanto com hospedeiro como com a micobactéria infectante.

Já foram demonstrados como fatores do hospedeiro que predisõem ao desenvolvimento da TB os polimorfismos nos genes para receptores TLR-2 (BEN-ALI et al, 2004), de vitamina D (BELLAMY et al, 1999) e para MHC (BOTHAMLEY et al, 1989). De forma similar, alterações em alguns componentes do sistema imune facilitam o desenvolvimento da doença, como tem sido observado em indivíduos infectados com HIV e em indivíduos que tem expressão alterada de

receptores para IFN- γ e IL-12 (NEWPORT et al, 1996; ALTARE et al, 1998; de JONG et al, 1998).

Os efeitos de diferentes cepas de Mtb no desenvolvimento da doença também têm sido analisados. Diferentes rotas de entrada do Mtb podem levar à distinta transdução de sinal, ativação da resposta imune podendo resultar na sobrevivência intracelular do bacilo. De fato, cepas virulentas são reconhecidas e fagocitadas via MR, enquanto cepas atenuadas não (SCHLESINGER LS, 1993), sugerindo que essa rota de entrada pode ser vantajosa para a micobactéria. A fagocitose via MR não leva a produção de O₂⁻ (ASTARIE-DEQUEKER et al, 1999), e o Mtb induz uma sinalização anti-inflamatória por esse receptor (NIGOU et al, 2001).

Além disso, já foi relatado que infecções provocadas pelo Mtb podem modificar a migração e inibir a maturação das DCs. Experimentos *in vitro* demonstraram que os bacilos de Mtb são capazes de alterar a migração de MoDCs (células dendríticas derivadas de monócito) dependendo da cepa responsável pela infecção, podendo inibir a ativação de células T antígeno-específicas (RAJASHREE et al, 2008)

Já a comparação de camundongos infectados com cepas de Mtb de diferentes genótipos mostrou comportamentos distintos da doença com relação à mortalidade, carga bacilar no pulmão e patogênese (LOPEZ et al, 2003). Em outro estudo foi demonstrado que a infecção de camundongos com uma cepa pouco virulenta, CDC1551, induziu a produção de altos níveis de RNAm de TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6 quando comparados com camundongos infectados com a cepa H37Rv (MANCA et al, 1999).

Alguns trabalhos têm demonstrado que as cepas patogênicas induzem menos apoptose nas células do hospedeiro quando comparadas com cepas atenuadas (KEANE et al, 1997). Essa diferença foi explicada pela indução seletiva com liberação de receptores solúveis de TNF- α (TNF-R2) pelas cepas patogênicas (BALCEWICZ-SABLINSKA et al, 1998). Essa liberação de receptores para TNF- α é regulada pela produção de IL-10 (BALCEWICZ-SABLINSKA et al, 1998). Portanto, cepas patogênicas de Mtb podem induzir a produção de IL-10, levando à diminuição da atividade de TNF- α e redução da apoptose de células infectadas. O LAM também pode prevenir a apoptose de células infectadas com Mtb *in vitro* de maneira dependente de Ca²⁺ (ROJAS et al, 2000).

Com relação à tuberculose causada por isolados multidroga resistentes (MDR-TB) alguns trabalhos têm relatado o seu freqüente acompanhamento por imunodepressão

do hospedeiro, sendo esse um problema que merece cada vez mais atenção dos pesquisadores. Em um trabalho foi demonstrado diminuição na produção de IFN- γ concomitantemente ao aumento de IL-10 e IL-18 em resposta ao PPD em pacientes com MDR-TB quando comparados à pacientes com tuberculose não-resistente (NR-TB) (LEE et al, 2002). Outros estudos também observaram aumento na produção de IL-10 em alguns pacientes com MDR-TB (MCDYER et al, 1997), que pode ser consequência da ação de células T reguladoras.

Um trabalho realizado por Fujiwara e cols mostrou que as cepas multidroga resistentes são capazes de induzir maior produção de IL-10 do que cepas sensíveis. Neste estudo, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas de voluntários saudáveis com teste tuberculínico positivo foram estimuladas *in vitro* com 5 cepas de Mtb MDR ou 5 cepas de Mtb sensíveis a drogas anti-tuberculose. As CMSP foram cultivadas com as preparações micobacterianas por 1, 3 e 5 dias. A média de produção de IL-10 pelas CMSP estimuladas com cepas MDR foi maior quando comparadas com as CMSP estimuladas com as cepas sensíveis com três dias de incubação (FUJIWARA et al, 1996).

A história natural da tuberculose mostra que a maioria dos indivíduos é resistente, provavelmente por sua habilidade em gerar uma resposta imune eficaz contra a infecção pelo *M. tuberculosis*. O fato de apenas 10% a 30% dos indivíduos que são expostos ao bacilo se tornarem infectados indica que alguns indivíduos são capazes de eliminar o bacilo antes mesmo que ocorra a sua instalação no pulmão, não apresentando sensibilidade tardia no teste intradérmico com PPD. Dos indivíduos que se tornam infectados e adquirem sensibilidade tardia a antígenos micobacterianos, evidenciada pelo resultado positivo ao teste com PPD, 90% ou mais não desenvolvem a tuberculose, o que indica que esses indivíduos são capazes de controlar a infecção completamente, ou a níveis incapazes de causar doença (NORTH and JUNG, 2004).

Porém, o trabalho de Verver e cols demonstrou que a taxa de incidência de tuberculose atribuída à re-infecção após tratamento com sucesso foi quatro (4) vezes maior do que novos episódios de tuberculose, sugerindo que indivíduos que tiveram tuberculose apresentam um risco elevado de desenvolverem tuberculose quando re-infectados (VERVER et al, 2005). Estes resultados desafiam a hipótese de que, em indivíduos imunocompetentes a infecção por uma cepa de Mtb confere proteção

contra uma re-infecção subsequente por outra cepa. Neste contexto, acredita-se que a pré-exposição ao Mtb pode ser um fator determinante na susceptibilidade à TB.

Dessa maneira é notável a necessidade de estudos que comparem as respostas de indivíduos positivos e negativos para PPD perante cepas de Mtb sensíveis e multidroga resistentes buscando elucidar a resposta imune solicitada por esses diferentes isolados na tentativa de revelar as estratégias pelas quais eles superam o equilíbrio imunológico do hospedeiro levando ao estabelecimento da doença.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar diferentes parâmetros da resposta imune de indivíduos com teste para PPD positivo ou negativo perante isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e multidroga resistentes.

2.2. Específicos

- Em culturas de sangue total de amostras de indivíduos PPD+ e PPD-:

- Avaliar a secreção de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10) em amostras infectadas com isolados clínicos de *Mtb* sensíveis e multidroga resistentes.
- Avaliar a frequência de células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ em amostras infectadas com isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e multidroga resistentes.
- Avaliar, através de contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia), a proliferação de isolados clínicos de *M. tuberculosis*.
- Avaliar a dosagem de NO em amostras infectadas com isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

- Em culturas de macrófagos derivados de monócitos:

- Avaliar a atividade fagocítica em amostras de indivíduos PPD+ e PPD- e relacionar com a dosagem de NO em sobrenadante de culturas de sangue total infectadas com isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

- Em culturas de CMSP de amostras de indivíduos PPD+ e PPD-:
- Avaliar a proliferação de isolados de *M. tuberculosis* após depleção de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺.
 - Avaliar os níveis de citocinas após depleção de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo do estudo

O presente trabalho é um estudo descritivo, transversal, para avaliação da proliferação do Mtb, do perfil de citocinas e da frequência de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$) em culturas de sangue total e de CMSP infectadas com isolados de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e multidroga resistentes. 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.

3.2. Seleção dos isolados de *M. tuberculosis*

Um total de 14 isolados de *M. tuberculosis* que foram disponibilizadas pelo Núcleo de Doenças Infecciosas foram selecionadas com base nas informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais disponíveis, sendo classificadas nos seguintes grupos: a) multi-resistentes à drogas anti-tuberculose – MDR (6 isolados); b) sensíveis a drogas anti-tuberculose (6 isolados); também foram utilizadas as cepas controles do *M. tuberculosis* avirulenta ATCC 25177 (H37Ra) e virulenta ATCC 27294 (H37Rv). Todas as cepas de *M. tuberculosis* selecionadas estavam congeladas em freezer a -70 °C.

3.3. Caracterização dos participantes do estudo

No período do estudo foram selecionados 11 voluntários que possuíam:

- Teste intradérmico com PPD (*purified protein derivative*) positivo (PPD+).
- Diagnóstico de tuberculose ativa excluído por raio X de tórax e exame de escarro (baciloscopia e cultura), se necessário.
- Idade entre 18 e 60 anos.

Foram selecionados também 11 voluntários com teste para PPD negativo (PPD-).

OBS: Não foi feito teste para HIV, pois a prevalência é baixa (< 0,5%) na população de Vitória.

Nem todos os voluntários foram utilizados em todos os experimentos, visto que eles foram arrolados ao longo do estudo.

3.4. Avaliação hematológica

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação hematológica no início do estudo com a contagem global de leucócitos pelo método de Turk. A avaliação hematológica foi utilizada para o cálculo da concentração da suspensão bacteriana usada na cultura utilizando um MOI (*multiplicity of infection*) de 1:10 (uma bactéria para 10 macrófagos), sendo as suspensões ajustadas para cada indivíduo considerando que o sangue total possui, em média, 6% de monócitos. Para isto foram utilizadas amostras de sangue coletadas em tubos heparinizados (BD Vacutainer).

3.5. Preparo dos inóculos dos isolados de Mtb

Os 14 isolados/cepas estudados foram retirados do armazenamento em freezer a -70 °C e repicados para frascos com meio de cultura Ogawa para que pudessem ser preparadas.

O procedimento descrito abaixo foi repetido para todos os isolados.

Após 2 a 3 semanas de crescimento foram retiradas do frasco com a cultura duas alças cheias de micobactéria e transferidas para um tubo com tampa de rosca e pérolas de vidro contendo aproximadamente 2 ml de PBS (*phosphate buffered saline*) com TWEEN 80 a 0,25%. Em seguida o tubo foi agitado por 1 minuto no aparelho Vórtex para rompimento dos grumos de micobactéria. Após a agitação o tubo permaneceu em repouso por 30 minutos e o sobrenadante obtido após esse período foi transferido para outro tubo com tampa de rosca e pérolas de vidro utilizando pipeta Pasteur e agitado rapidamente.

Outro tubo com tampa de rosca e pérolas de vidro contendo 4,5ml de PBS com TWEEN 80 a 0,25% foi separado previamente e nele foram acrescentadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur cerca de 15 gotas da suspensão bacteriana. Feito isso a densidade óptica (DO) foi medida em um espectrofotômetro a 265nm para verificação da concentração bacteriana na suspensão. A concentração desejada para a preparação do inóculo era 10^7 UFC/ml, que corresponde a escala 1 de Mac Farland e a uma DO entre 0,3 a 0,35. Caso a DO estivesse acima do valor desejado mais PBS era acrescentado e quando a DO estava abaixo do valor mais gotas da suspensão da bactéria eram colocadas.

A seguir 500µl de cada suspensão preparada no item anterior foram transferidos para tubos Eppendorfs e centrifugadas a 13.250 g em micro-centrífuga por 10 minutos. Foi

retirado o sobrenadante (PBS c/ Tween 80 a 0,25%) cuidadosamente para não remover o *pellet* e ressuspendido com PBS com Tween 80 a 0,25% qsp 500 μ l (1^a lavagem) e agitado em vórtex. Na seqüência as suspensões foram centrifugadas novamente a 13.250 g na micro-centrífuga por 10 minutos e foram retirados os sobrenadantes cuidadosamente. O volume foi completado novamente para 500 μ l com PBS com Tween 80 à 0,25% e agitado em vórtex para nova centrifugação a 13.250 g em micro-centrífuga por 10 minutos (2^a lavagem). Foi retirado o sobrenadante cuidadosamente e o volume foi completado para 500 μ l com meio RPMI 1640 completo e lavado ao vórtex para homogeneizar.

A seguir as suspensões foram sonicadas e para isso os Eppendorfs foram colocados no aparelho Lysor e submetidos a 1 ciclo de sonicação.

Foram realizadas diluições seriadas com RPMI 1640 completo a partir desses Eppendorfs até a diluição 10^{-7} para o controle de concentração do inóculo (CCI). Também foi feita outra diluição para um MOI (*multiplicity of infection*) de 1:10 (uma bactéria para 10 macrófagos), ajustada para cada voluntário, que foi utilizada no presente estudo para a infecção das culturas de sangue total, de macrófagos e de CMSP, conforme mostrado na figura 6.

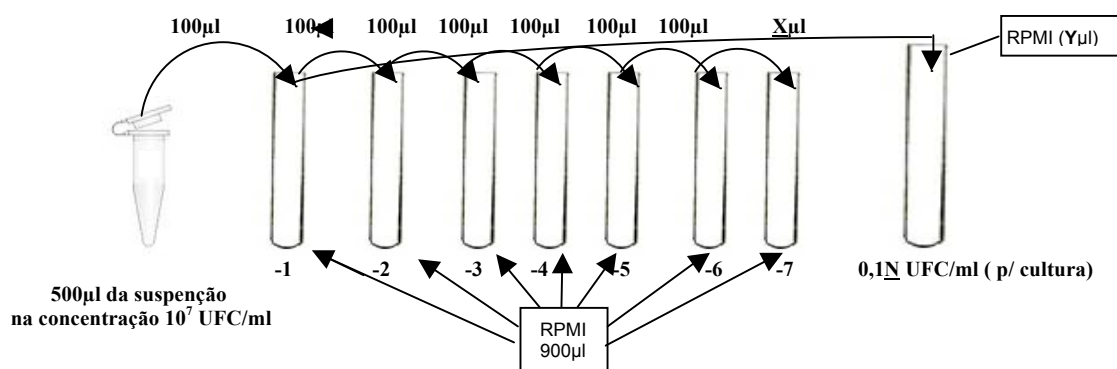


Figura 5. Diluição da suspensão bacteriana para o controle de concentração do inóculo (CCI) e para a infecção. X (volume da suspensão retirada do tubo com diluição 10^{-1} para ser diluído para a infecção da cultura); Y (volume de meio RPMI 1640 completo usado para diluir a suspensão bacteriana para utilizar na cultura); N (concentração de monócitos na amostra do voluntário).

O conteúdo do tubo proveniente da segunda diluição para 10^{-3} foi utilizado na infecção das culturas e as demais diluições foram plaqueadas em placas de Petri quadri-partidas contendo meio Middlebrook 7H10. A suspensão também foi plaqueada em Ágar sangue para verificação da pureza da mesma.

3.6. Culturas de sangue total

As amostras de sangue total foram misturadas com cada inóculo em placas de 24 poços. O volume final obtido por poço foi 1ml (500µl de sangue + 500µl de inóculo). As placas foram previamente identificadas com o doador da amostra de sangue, o isolado inoculado e o tempo de incubação para a coleta do sobrenadante. Os poços controle terão apenas sangue do doador e meio de cultura RPMI 1640 completo também com um volume final de 1 ml (500µl de sangue + 500µl de RPMI).

Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Foram coletados o sobrenadante e as células das culturas após 24 e 72hs de incubação. O sobrenadante foi transferido para tubos de micro-centrífuga e centrifugado por 10 min a 13.000 rpm. Feito isso ele foi dividido em dois criotubos e armazenando em freezer -70°C para posterior detecção e quantificação de citocinas. Já as células foram imediatamente utilizadas para o processo de fenotipagem com detecção da expressão de CD4, CD25 e Foxp3.

3.7. Cultura de CMSP na presença e ausência de células T CD4⁺CD25⁺

Primeiramente foi feita a separação de CMSP desses indivíduos conforme descrito a seguir.

Foram coletados 30 ml de sangue venoso heparinizado de cada indivíduo. O sangue foi dividido em duas partes iguais em tubos de polipropileno de 50 ml com tampa de rosca. Ao sangue foi adicionado o mesmo volume de PBS (Phosphate buffered saline). Em dois outros tubos foi colocado 15 ml de Ficoll-Hypaque e, sobre o Ficoll, foi adicionado gentilmente os 30 ml da mistura de sangue/PBS para que a mistura não penetre no Ficoll.

Feito isso os tubos foram centrifugados a 300g por 30 minutos em temperatura ambiente e sem freio. Após a centrifugação a camada de células mononucleares formada entre as camadas de Ficoll-Hypaque e plasma foi coletada com uma pipeta Pasteur estéril e transferida para outro tubo de polipropileno com tampa de rosca de 50 ml. Em seguida foi adicionado PBS até completar um volume total de 50 ml para primeira lavagem das células. O tubo foi centrifugado a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram feitas mais 2 lavagens. Ao final das lavagens as células foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI 1640 com L-glutamina 20mM e HEPES 0.1M, e uma alíquota (10 µl) foi diluída em corante azul de Trypan em diluição 1:5 (10 µl de células para 40 µl de Trypan) e contadas em câmara de

Neubauer.

Após a contagem das células, o tubo foi centrifugado a 300g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 3 ml de meio RPMI 1640 com L-glutamina 20mM e HEPES 0.1M. Metade desse volume (1,5ml) foi transferido para um microtubo e utilizado para a separação de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ por meio de separação magnética e a outra foi utilizada dessa maneira para a cultura.

3.7.1. Depleção de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ por meio de separação magnética

3.7.1.1. Marcação magnética de células $CD4^+$

Para a realização desse procedimento foi utilizado o Kit *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation* da Miltenyi Biotec seguindo as instruções do fabricante.

A suspensão de CMSP foi centrifugada a 300g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 90 μ l de PBS com 1% de BSA (Bovine serum albumin) e EDTA 2mM. Foi adicionado 10 μ l *CD4⁺ T cell biotin-Antibody Cocktail* homogeneizando bem e com incubação de 10 minutos ao abrigo da luz e a 8°C. Feito isso, foi adicionado 20 μ l de *Anti-Biotin MicroBeads* homogeneizando bem e com incubação de 15 minutos ao abrigo da luz e a 8°C. Após a incubação foi adicionado 1,5 ml de PBS com BSA 1% e EDTA 2mM e foi feita centrifugação a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 μ l de PBS com BSA 1% e EDTA 2mM.

3.7.1.2. Depleção das células $CD4^+$

Para a depleção das células $CD4^+$ foi utilizada a coluna LD e o separador *MidiMACS* ambos da Miltenyi Biotec.

A coluna foi adaptada ao separador e preparada com uma lavagem com 2 ml de PBS com BSA 1% e EDTA 2 mM. Em seguida a suspensão celular foi aplicada na coluna e as células não ligadas ($CD4^+$) foram coletadas em um tubo de polipropileno de 15 ml com tampa de rosca. Na sequência a coluna foi lavada 3 vezes com 1 ml de PBS com BSA 1% e EDTA 2 mM para coletar o restante das células não ligadas. Feito isso a coluna foi retirada do separador e lavada mais 3 vezes com PBS com BSA 1% e EDTA 2mM para a retirada das células marcadas ($CD4^+$) que foram coletadas em outro tubo de polipropileno de 15 ml com tampa de rosca.

Os tubos com as células coletadas foram centrifugados a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo com as células CD4⁺ prosseguiu para a separação das células CD25⁺ e a ele foi acrescentado 90 µl de PBS com BSA 1% e EDTA 2mM, enquanto o tubo com as células CD4⁻ foi mantido em gelo e a ele foi acrescentado 500 µl de RPMI 1640 com L-glutamina 20mM e HEPES 0,1M.

3.7.1.3. Marcação magnética de células CD25⁺

As células CD4⁺ foram marcadas com 10 µl de MicroBeads CD25 e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz e a 8°C. Em seguida foi adicionado 1,5 ml de PBS com BSA 1% e EDTA 2mM e foi feita centrifugação a 300g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µl do mesmo tampão.

3.7.1.4. Seleção positiva de células CD25⁺

Para a seleção positiva das células CD25⁺ foi utilizada a coluna MS e o separador *MiniMACS* ambos da Miltenyi Biotec.

A coluna foi adaptada ao separador e preparada com uma lavagem com 1ml de PBS com BSA 1% e EDTA 2 mM. Em seguida a suspensão celular foi aplicada na coluna e as células não ligadas (CD25⁻) foram coletadas em um tubo de polipropileno de 15 ml com tampa de rosca. Para aumentar a pureza da cultura a fração eluída foi passada novamente pela coluna. Na sequência a coluna foi lavada 3 vezes com 1ml de PBS com BSA 1% e EDTA 2 mM para coletar o restante das células CD25⁻ não ligadas. A coluna foi removida do separador e descartada.

Em seguida o tubo com as células CD25⁻ eluídas foi centrifugado a 300g por 10 minutos. Feito isso o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1ml de meio RPMI 1640 com L-glutamina 20mM e HEPES 0,1M e adicionadas às células CD4⁻ separadas anteriormente completando um volume de 1,5ml. Todas as depleções foram verificadas por citometria de fluxo.

3.7.2. Infecção de CMSP

As amostras de CMSP com e sem células CD4⁺CD25⁺ foram misturadas com cada inóculo e o volume final obtido foi 600 µl (300µl de células + 300µl do inóculo). As células foram acrescentadas aos inóculos anteriormente colocados em microtubos. Os microtubos foram previamente identificados com o doador das células, o isolado

inoculado e o tempo de incubação para a coleta do sobrenadante. Para esse procedimento foram utilizados somente 1 isolado de Mtb sensível à drogas anti-tuberculose e 1 isolado multidroga resistente. O MOI utilizado nessa cultura foi de 1:10 (uma bactéria para 10 macrófagos), sendo a concentração o inóculo ajustada para cada voluntário de acordo com a concentração de monócitos após a contagem de células no isolamento das CMSP.

Essas culturas permaneceram em aparelho para rotação contínua (rotator) por 4 horas, para quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) no tempo zero, e 72 horas à 37C e 5% CO₂.

3.8. Citometria de Fluxo

Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Bioscience e utilizados de acordo com as instruções do fabricante, modificadas conforme descrito a seguir.

3.8.1. Expressão de marcadores característicos de linfócitos Treg

As células das culturas de cada um dos indivíduos foram distribuídas em 2 tubos de poliestireno de 12 x 75 mm para citometria em um volume de 100µl por tubo e incubadas por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz com 2µl dos anticorpos monoclonais específicos para o marcador de superfície celular de interesse, conjugados com fluorocromos distintos (Tabela 1). Após o período de incubação as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, também ao abrigo da luz, utilizando para isso 1 ml da solução de lise comercial (*FACS Lysing Solution* – Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada por 15 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 7 minutos a 300 g. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 2ml de PBS e centrifugadas novamente por 7 minutos a 300 g.

Neste momento as células marcadas no tubo 1 foram fixadas com 300µl de solução fixadora (paraformaldeído 1%, cacodilato de sódio 1,08%, cloreto de sódio 0,67%) e armazenadas a 4C até o momento da leitura no citômetro, enquanto as marcadas no tubo 2 seguem o protocolo de permeabilização e marcação intracelular. Essas amostras foram então incubadas por 30 minutos com 100µl da solução de fixação comercial (*IC Fixation Buffer* – Becton Dickinson). Em seguida as células foram lavadas com 1ml de solução de permeabilização comercial (10X Permeabilization Buffer – Becton Dickinson) diluída em água destilada e centrifugadas por 5 minutos a 300 g. Na

seqüência as células foram incubadas por 30 minutos com 2µl do anticorpo anti-Foxp3 PE e com 100µl da mesma solução de permeabilização. Então as células foram lavadas com 1ml da solução de permeabilização e centrifugadas por 5 minutos a 300 g. Finalmente as amostras foram ressuspensas em 300µl da mesma solução fixadora utilizada no tubo 1 para fixação das células.

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

Tubo	Anticorpo	Fluorocromo	Clone
Tubo 1 (Controle Isotípico)	Anti-IgG1	FITC	P3
	Anti-IgG2a	PE	eBM2a
	Anti-IgG2b	PE-Cy5	eBMG2b
Tubo 2 (Célula Treg)	Anti-CD4	PerCP	SK3
	Anti-CD25	FITC	BC96
	Anti-Foxp3	PE	236A/E7

Após incubação de 30 minutos a 4°C foi determinada a análise dos parâmetros fenotípicos das preparações celulares utilizando o citômetro de fluxo *FACSortTM* da Becton Dickinson. Foram adquiridos 30.000 eventos por tubo. As células foram selecionadas pelo programa *Cell Quest* de acordo com parâmetros de tamanho (FSC - *Foward Scatter*), granulosidade (SSC - *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com *Phicoerithrin* (PE), *Phycoerythrin-Cy5* (PE-Cy5), fluorescein isothiocyanate (FITC) e *peridinin chlorophyll protein* (PerCP). A Figura 7 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise de células T reguladoras com fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$. Inicialmente foi determinada a população de linfócitos T baseada em aspectos morfométricos através de gráficos de distribuição pontual de tamanho *versus* granulosidade com a seleção da região de interesse (R1) (Figura 6A), gráficos de FL1/CD4 *versus* FL2/CD25 foram construídos, permitindo identificar a segregação da população $CD4^+$ em 3 subpopulações: $CD4^+CD25^-$ (R2), $CD4^+CD25^{LOW}$ (R3) e $CD4^+CD25^{HIGH}$ (R4) (Figura 6B). A partir de R4 foram construídos gráficos de FL1/CD25 *versus* FL2/Foxp3 permitindo a determinação do percentual de células reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ na população de linfócitos totais (Figura 6C).

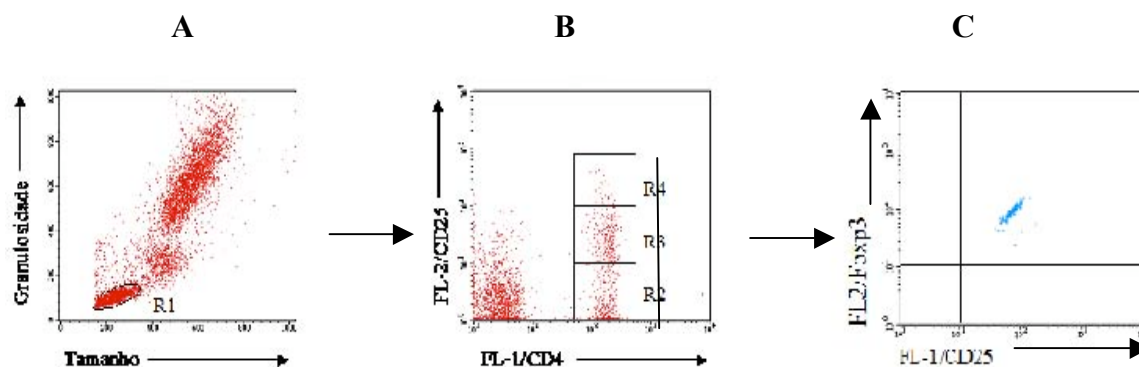


Figura 6. Seqüência dos procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$) por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho *versus* Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso, os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD4 *versus* FL2/CD25 utilizado para selecionar a subpopulação celular $CD4^+CD25^{HIGH}$ específica em R4. C) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL2/Foxp3 utilizado para quantificar o percentual de células $Foxp3^+$ em R4 ($CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$).

3.8.2. Detecção e quantificação de citocinas

Esse processo foi realizado com a utilização do kit *BD Cytometric Bead Array (CBA)* TH1/TH2 (Becton Dickinson) de acordo com as instruções do fabricante modificadas conforme descrito a seguir.

As amostras foram descongeladas em banho-maria a $37^{\circ}C$. Durante o descongelamento o padrão utilizado no kit foi reconstituído em um tubo com 2 ml do Reagente G. O tubo contendo o padrão reconstituído foi identificado como TS (*Top Standard*) e deve permanecer em repouso por pelo menos 15 min e durante esse período deve ser homogeneizado suavemente em intervalos de 3 min.

A seguir 8 tubos de poliestireno de 12 x 75 mm foram enumerados para realização das seguintes diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256. Foram adicionados 300 μ l de G em todos os tubos. Feito isso, foi realizada uma diluição em série transferindo 300 μ l da solução padrão TS para o tubo com diluição 1:2 misturando cuidadosamente. Na seqüência foram feitas diluições sucessivas transferindo 300 μ l até o tubo com diluição 1:256 misturando cuidadosamente. Um tubo adicional foi acrescentado como controle negativo (CN), contendo somente reagente G.

As beads de captura vêm armazenadas individualmente e é necessário fazer uma mistura desses reagentes (A1-A6) imediatamente antes de misturá-los com o reagente de detecção B, padrões e amostras.

O número de tubos usados no experimento foi calculado previamente para que fosse determinado o volume necessário de cada reagente, sendo preciso cerca de 10 µl de cada suspensão de beads para cada tubo a ser testado (incluindo padrões e controles). Cada suspensão de beads deve ser misturada em vórtex vigorosamente por alguns segundos antes da mistura. Feito isso, as suspensões foram adicionadas a um único tubo identificado como “mistura de beads”.

Após a preparação da mistura de beads foram adicionados 50 µl da mesma em todos os tubos a serem testados. 50µl do Reagente B (Reagente de detecção marcado com PE) também foram adicionados em todos os tubos testados. A seguir, 50µl das diluições do padrão e 50µl das amostras foram adicionados aos seus respectivos tubos. A seguir, os tubos foram encubados por 3hs, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o período de incubação foram adicionados 1ml do Reagente F em cada tubo e foram centrifugados a 300 g por 7 min a 18°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente utilizando para isso uma bomba de vácuo deixando em cada tubo aproximadamente 100 µl. A seguir, foi realizada a calibração do citômetro conforme instruções do fabricante e, em seguida foi feita a leitura.

Os limites teóricos de detecção são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Limites teóricos de detecção de citocinas pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*) utilizando o Kit *Human Th1/Th2 Cytokine*.

Citocina	Mediana da Fluorescência	Desvio padrão	Limite de Detecção (pg/ml)
IL-2	3,3	0,2	2,6
IL-4	2,3	0,2	2,6
IL-5	2,6	0,2	2,4
IL-10	2,4	0,2	2,8
TNF-α	2,0	0,2	2,8
IFN-γ	2,1	0,3	7,1

Para a leitura dos dados no citômetro, o modelo de aquisição (Figura 8) foi obtido do site: bdbiosciences.com/cbatemplates. O número de eventos a serem contados foi ajustado para 1.800 na região R1. Em seguida, foi feita a leitura do primeiro tubo para

colocar R1 em torno da população de beads (Figura 8). Na sequência, as amostras foram lidas.

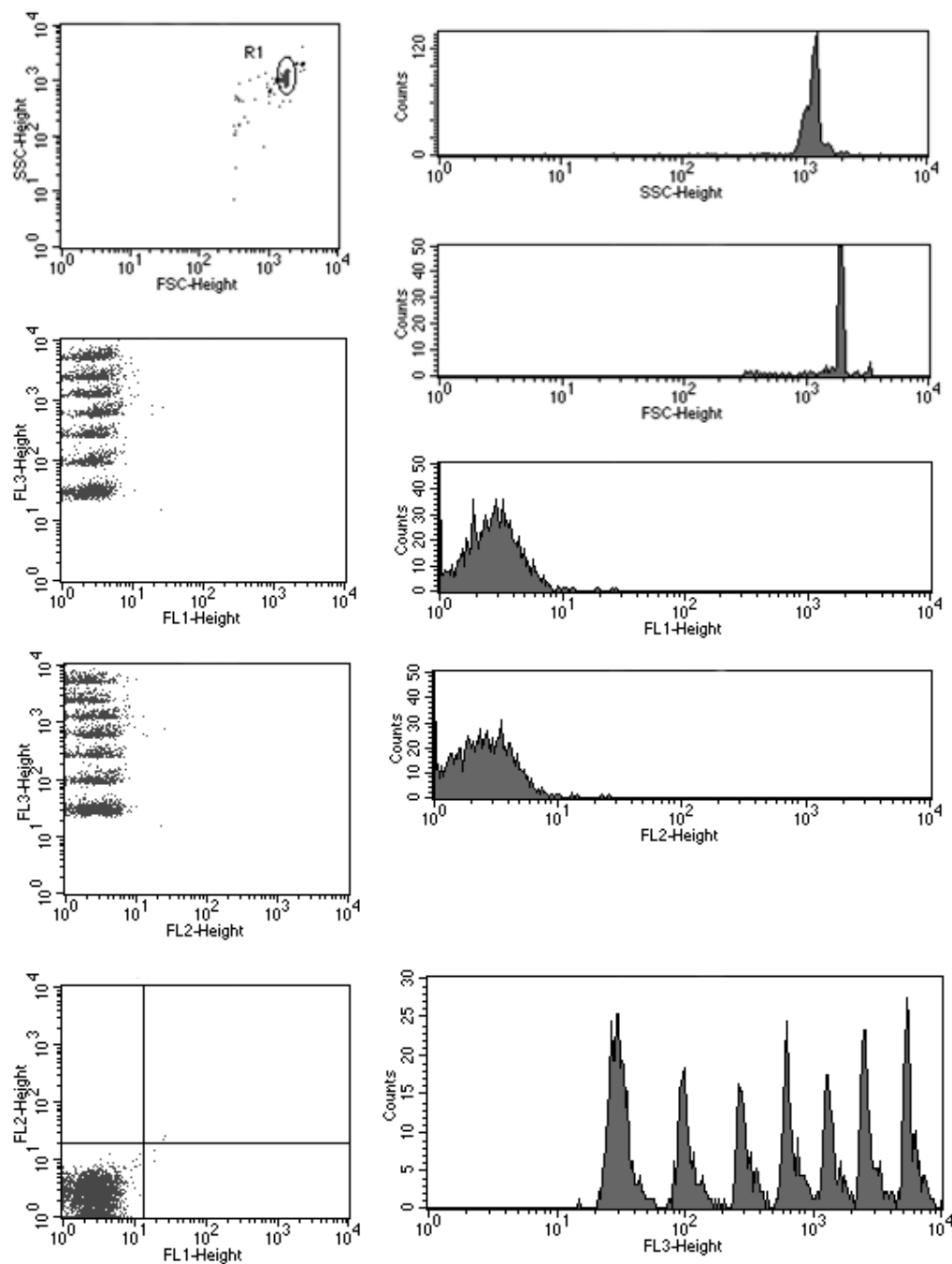


Figura 7. Modelo de aquisição para leitura das amostras pelo método de CBA (*Cytometric Bead Array*) utilizando o Kit *Human Th1/Th2 Cytokine*, obtido a partir do site bdbiosciences.com/cbatemplates. A região R1 foi ajustada para a seleção da população de interesse, nesse caso a população de beads.

3.9. Avaliação da capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ e PPD-

As amostras foram misturadas com cada inóculo e o volume final obtido foi 600 μ l (300 μ l de sangue + 300 μ l do inóculo). A amostra foi acrescentada ao inóculo

anteriormente colocado em microtubos. Os microtubos foram previamente identificados com o doador da amostra, o isolado inoculado e o tempo de incubação para a coleta do sobrenadante. Para esse procedimento foram utilizadas somente as cepas controles H37Ra e H37Rv, 1 isolado de Mtb sensível à drogas anti-tuberculose e 1 isolado multidroga resistente. O MOI utilizado para essa cultura foi de 1:10 (uma bactéria para 10 macrófagos), sendo a concentração do inóculo ajustada para cada voluntário de acordo com a concentração de monócitos após a avaliação hematológica. Essas culturas permaneceram em aparelho para rotação contínua (rotator) por 4 horas, para quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) no tempo zero, e 72 horas à 37°C e 5% CO₂.

Após os respectivos períodos de incubação (4 e 72 horas) os tubos com as culturas de sangue total foram centrifugados por 5 minutos a 13000g. Em seguida foram retirados 400 µl do sobrenadante e adicionou-se 900 µl de água estéril a cada tubo de cultura para a lise das células. Os tubos foram agitados em vórtex e ficaram em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram agitados em vórtex novamente e centrifugados a 13000g por 10 minutos. Posteriormente foi removido 800 µl de sobrenadante de cada tubo e foram novamente agitados em vórtex. Por fim, foram feitas diluições seriadas do volume restante em cada tubo (aproximadamente 300 µl) com PBS contendo Tween 80 à 0,25% até 10⁻³ para plaqueamento em placas de Petri quadri-partidas contendo meio Middlebrook 7H11. Após o plaqueamento as placas foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. As placas foram acompanhadas durante 21 dias e então foi feita a contagem das UFCs.

3.10. Avaliação da atividade fagocitária dos macrófagos em culturas infectadas com isolados de *M. tuberculosis*

Com o objetivo de verificar se os indivíduos negativos ao teste com PPD demonstraram a mesma capacidade de fagocitose que os positivos, foram realizadas culturas de macrófagos dos participantes com um isolado sensível e um multidroga resistente.

Primeiramente, foi feita a separação de CMSP a partir de amostras de sangue total conforme descrito no item.3.7. Após a contagem, as células isoladas foram centrifugadas a 300g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram ressuspensas em meio RPMI 1640 com L-glutamina 20mM e HEPES 0,1M para

uma concentração de 1×10^6 células/ml, foram colocadas em lâminas de acrílico com 16 poços (*Chamber Slide*), ficando 200 μ l em cada poço, e foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 2 horas para aderência dos monócitos. Em seguida o sobrenadante foi coletado para retirada das células não aderentes e foi adicionado novo meio RPMI qsp 200 μ l. Feito isso as lâminas voltaram para a estufa a 37°C com 5% de CO₂ onde permaneceram por 4 dias para maturação dos monócitos em macrófagos.

Após esse período o sobrenadante foi retirado e as células foram infectadas com os inóculos dos isolados de Mtb. O MOI utilizado foi de 1:10 (uma bactéria para 10 macrófagos) e o volume final em cada poço foi de 200 μ l.

Depois de 2hs e 4hs de infecção o sobrenadante foi retirado e armazenado e as lâminas foram fixadas a temperatura ambiente por 72hs. As lâminas foram então coradas pelo método de Ziehl Neelsen e os macrófagos que fagocitaram Mtb foram contados.

3.11. Dosagem da produção de Óxido Nítrico

Com o propósito de dosar a produção de NO como um parâmetro para ativação de macrófagos, foram coletados 50 μ l dos sobrenadantes armazenados das culturas de sangue total e transferidos para uma placa de 96 poços. Aos 50 μ l do sobrenadante foram adicionados 50 μ l do reagente de Griess. Após 10 minutos a placa foi lida a 570 nm. Foi feita uma curva padrão para determinação da concentração de nitrito: NaNO₂ a diluições de 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M; 3,12 μ M; 0 (em volume de 200 μ l/poço).

3.12. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prisma, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para comparação de dados com distribuição normal entre grupos, foi utilizado o teste T para amostras independentes. Para comparação de dados com distribuição não normal entre grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para análise de dados obtidos em tempos distintos, foi utilizado o Teste de Medidas Repetidas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3.13. Considerações éticas

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. A aprovação no

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico (CEP) foi obtida em 27 de maio de 2009, registro n 032/09.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos isolados utilizados no estudo

Neste estudo foram utilizados 12 isolados clínicos obtidos de amostras de secreção pulmonar (escarro) de pacientes com tuberculose com resultado de baciloscopia positiva. Estes isolados foram selecionados dentre os 22 isolados clínicos descritos anteriormente por Palaci e cols (PALACI M, 2001) (Tabela 3).

Tabela 3. Informações sobre procedência, subtipo genético e perfil de resistência a drogas anti-tuberculose dos isolados de *M. tuberculosis*.

RFLP ^a	Espécime ^b	Bacil. ^c	Nº Isolado	CIM (μ /ml) ^d				
				INH	RMP	PZA	EMB	SM
S1	Escarro	Pos	59502220	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
S2	Escarro	Pos	59602685	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
S3	Escarro	Pos	59500165	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
S4	Escarro	Pos	59501872	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
S5	Escarro	Pos	59400885	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
S6	Escarro	Pos	59700152	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
R1	Escarro	Pos	59702696	0,25	2,0	> 900,0	< 2,5	8,0
R2	Escarro	Pos	59801603	4,0	32,0	< 100,0	< 2,5	>128,0
R3	Escarro	Pos	59803053	4,0	32,0	> 900,0	< 2,5	> 128,0
R4	Escarro	Pos	59600228	8,0	8,0	> 900,0	< 2,5	< 2,0
R5	Escarro	Pos	59400272	8,0	128,0	> 900,0	< 2,5	< 2,0
R6	Escarro	Pos	59800669	> 4,0	> 32,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0

^a Subtipos genéticos do *M. tuberculosis* caracterizados pela técnica de RFLP-IS6110;

^b Origem da amostra do isolado;

^c Resultado do exame de baciloscopia (positiva ou negativa) no momento da consulta inicial;

^d Concentrações inibitórias mínimas das seguintes drogas: isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB) e estreptomicina (SM).

O perfil genético dos isolados de *M. tuberculosis* utilizados neste estudo, realizado através do método de RFLP- IS6110 no estudo de Palaci e cols, foi comparado ao da cepa referência MT 14323, cujo perfil apresenta bandas de 14.4, 7.2, 7.0, 4.4, 3.6, 3.0, 2.3, 2.0, 1.8, 1.5, 1.4, 1.0 kb (Figura 8) e demonstra que os isolados em questão são distintos entre si. O número de cópias do marcador IS6110 variou de 5 a 15, tendo a maioria dos isolados estudados mais de 7 cópias.

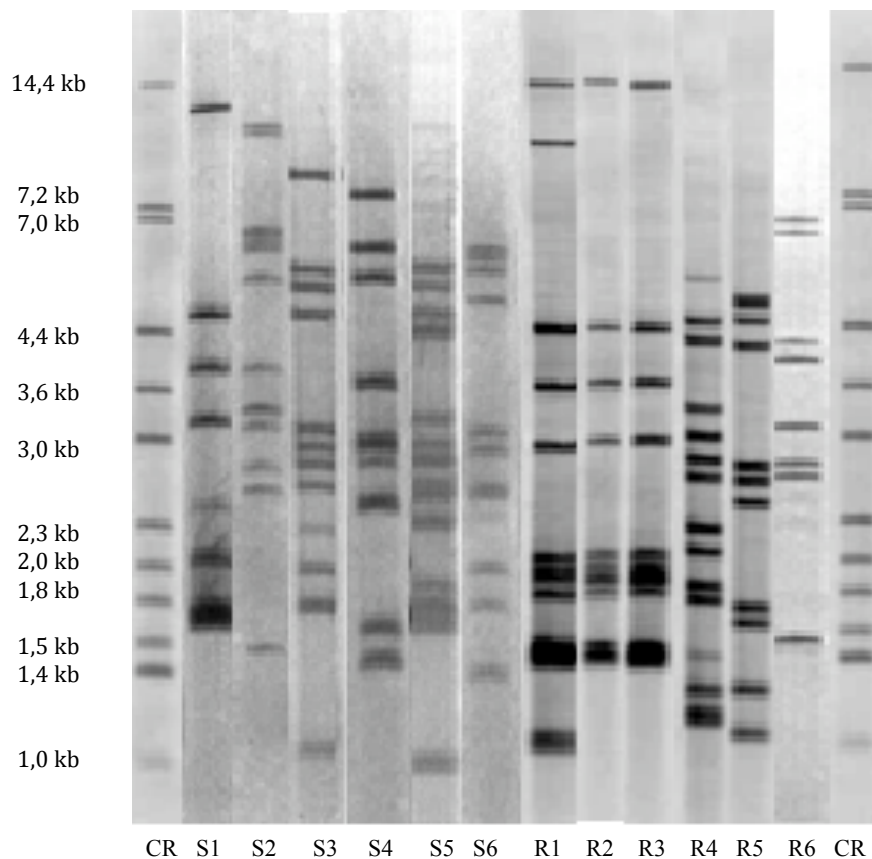


Figura 8. Perfis genéticos dos isolados de *M. tuberculosis* selecionados, definidos pelo método de RFLP IS6110. As letras seguidas de números indicam cada isolado obtido de amostra de pacientes. CR indica a cepa de referência MT 14323.

A seleção destes isolados levou em consideração informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Após a seleção os isolados objetos deste estudo foram estratificados em dois grupos: a) multi-resistentes às drogas anti-tuberculose (6 isolados = R1, R2, R3, R4, R5 e R6), e b) sensíveis às drogas anti-tuberculose (6 isolados = S1, S2, S3, S4, S5, e S6).

4.2. Caracterização dos indivíduos estudados

Vinte e dois voluntários clinicamente saudáveis foram convidados para fazer parte deste estudo, sendo 11 indivíduos com reação positiva ao PPD (PPD+), e 11 indivíduos com reação negativa ao PPD (PPD-). Dados demográficos destes voluntários são apresentados na tabela 4. Nem todos os indivíduos foram utilizados em todos os experimentos.

Tabela 4. Dados demográficos dos indivíduos clinicamente saudáveis PPD positivos e dos PPD negativos participantes do estudo. PPD (*purified protein derivative*).

Grupos	Sexo	N	Idade (anos)
			Média +/- Desvio Padrão
PPD positivo		11	
	Masculino	5	30 +/- 5
	Feminino	6	34 +/- 6
PPD negativo		11	
	Masculino	3	24 +/- 6
	Feminino	8	24 +/- 5

4.3. Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de sangue total infectadas com os isolados de *M. tuberculosis*

A concentração de citocinas no sobrenadante de culturas de sangue total infectadas pelos isolados selecionados e incubadas por 24hs foi determinada com o objetivo de avaliarmos se a infecção com isolados sensíveis (S) ou resistentes (R) aos fármacos anti-TB alteraria ou não o perfil da resposta imune de indivíduos PPD+ e PPD-. Para a condução deste experimento utilizamos 4 isolados de Mtb sensíveis (S1, S3, S4 e S5) e 4 isolados multidroga resistentes (R1, R3, R4 e R6), e amostras de sangue total de 6 indivíduos PPD+ e 6 indivíduos PPD-. Os resultados deste experimento são apresentados na figura 9.

Apesar de uma diferença significativa entre os níveis de citocinas referentes a cada um dos isolados utilizados tanto em indivíduos PPD- quanto entre os PPD+ não ter sido observada, a infecção com os isolados S1, S3, S5 e R3 induziram a um aumento nos níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 nos sobrenadante das culturas de sangue total no grupo PPD- (Figura 9). Estes dados sugerem que a infecção de células do

sangue periférico com isolados resistentes à droga não afetou de forma significativa a produção de citocinas no grupo de indivíduos PPD+ e PPD-, portanto diferenças na resistência aos fármacos não alteram o perfil de citocinas “*in vitro*”.

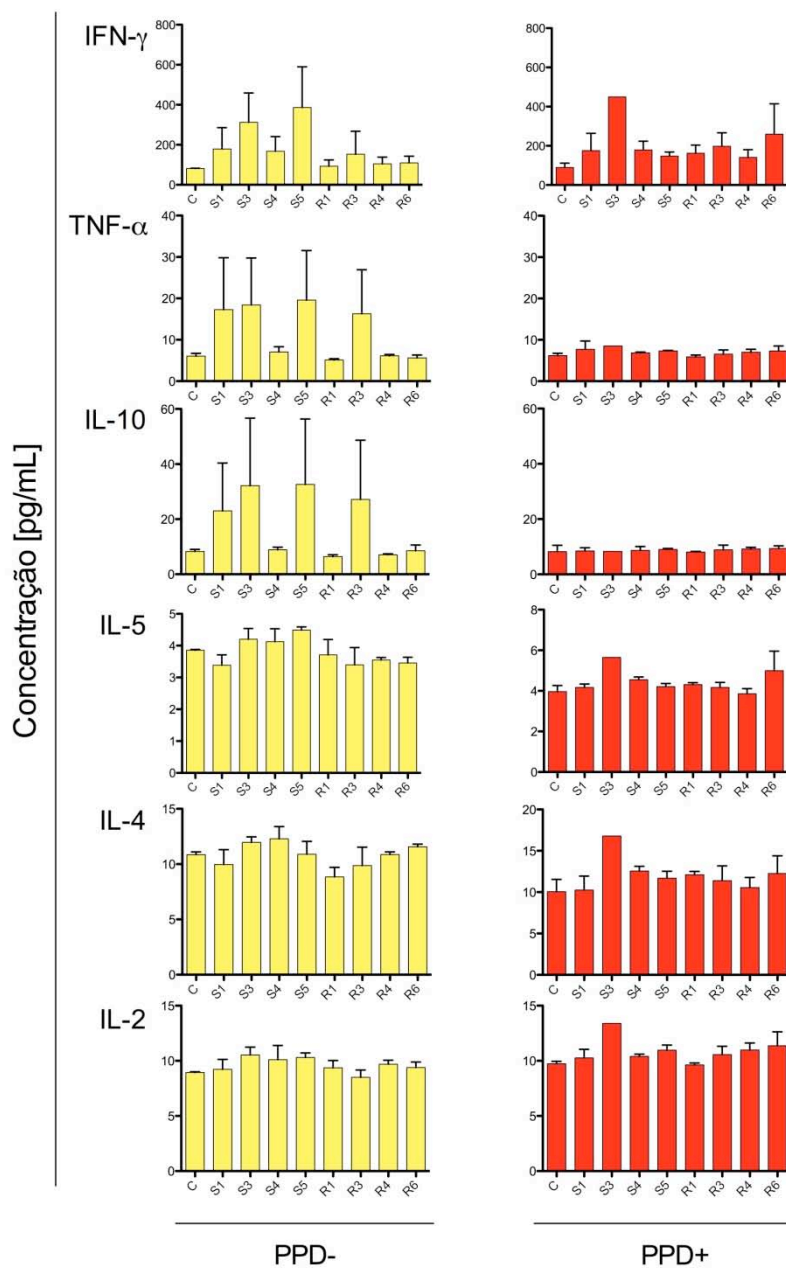


Figura 9. Níveis das citocinas (pg/ml) IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 nos sobrenadantes de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com isolados sensíveis (S1, S3, S4 e S5), com isolados multidroga resistentes (R1, R3, R4 e R6) e controle não infectado com 24hs de incubação. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina e desvio padrão para cada grupo analisado.

4.4. Freqüência de células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ nas culturas de sangue total infectadas com os isolados de *M. tuberculosis*

Apesar de diferenças significativas no perfil de citocinas frente aos diversos isolados testados não terem sido observadas, alguns isolados induziram uma elevação na produção de citocinas (S1, S3, S5 e R3) em culturas de sangue total do grupo PPD-. Considerando que a presença de células T reguladoras poderia afetar negativamente a produção de citocinas importantes na resposta contra o Mtb, a freqüência desta população foi avaliada nos grupos estudados (PPD+ e PPD-) durante a infecção com os diferentes isolados utilizados. Na condução deste experimento utilizamos 6 isolados sensíveis (S) e 6 multidroga resistentes (R) e duas cepas controle (H37Ra e H37Rv) para infectar culturas de sangue total de 6 indivíduos PPD+ e 6 indivíduos PPD-.

Assim como observado anteriormente em relação ao perfil de citocinas secretadas pós-infecção, a freqüência de linfócitos T reguladores não foi afetada significativamente por nenhum dos isolados e cepa-padrão utilizados na infecção quando comparadas entre si, tanto no grupo PPD- quanto no PPD+ (Figura 10 A).

A infecção de amostras de sangue total, tanto PPD- quanto PPD+, com os isolados S e R levou a um aumento significativo na freqüência de células T reguladoras quando comparadas as freqüências observadas em 24hs e 72hs pós-infecção (Figura 10 B).

Adicionalmente, um aumento significativo ($p < 0.05$) nas freqüências de linfócitos T reguladores foi observado nas culturas de sangue total de indivíduos PPD+ quando comparados aos PPD-, independente do isolado utilizado, tanto em 24hs quanto em 72hs pós-infecção (Figura 10 B).

Estes dados sugerem que apesar da infecção com isolados R ou S não afetar a concentração de células T reguladoras, a infecção de células de indivíduos PPD- ou PPD+ leva a uma expansão específica desta população celular. Por outro lado, e de certa forma já esperado, diferenças na freqüência de células T reguladoras foram observadas quando indivíduos PPD+ são comparados à indivíduos PPD-. Esta observação sugere que uma exposição prévia ao *M. tuberculosis* levaria a um aumento de células T reguladoras específicas para o MTB as quais responderiam a estímulos/infecção por isolados/cepas diferentes da cepa responsável pela conversão do PPD.

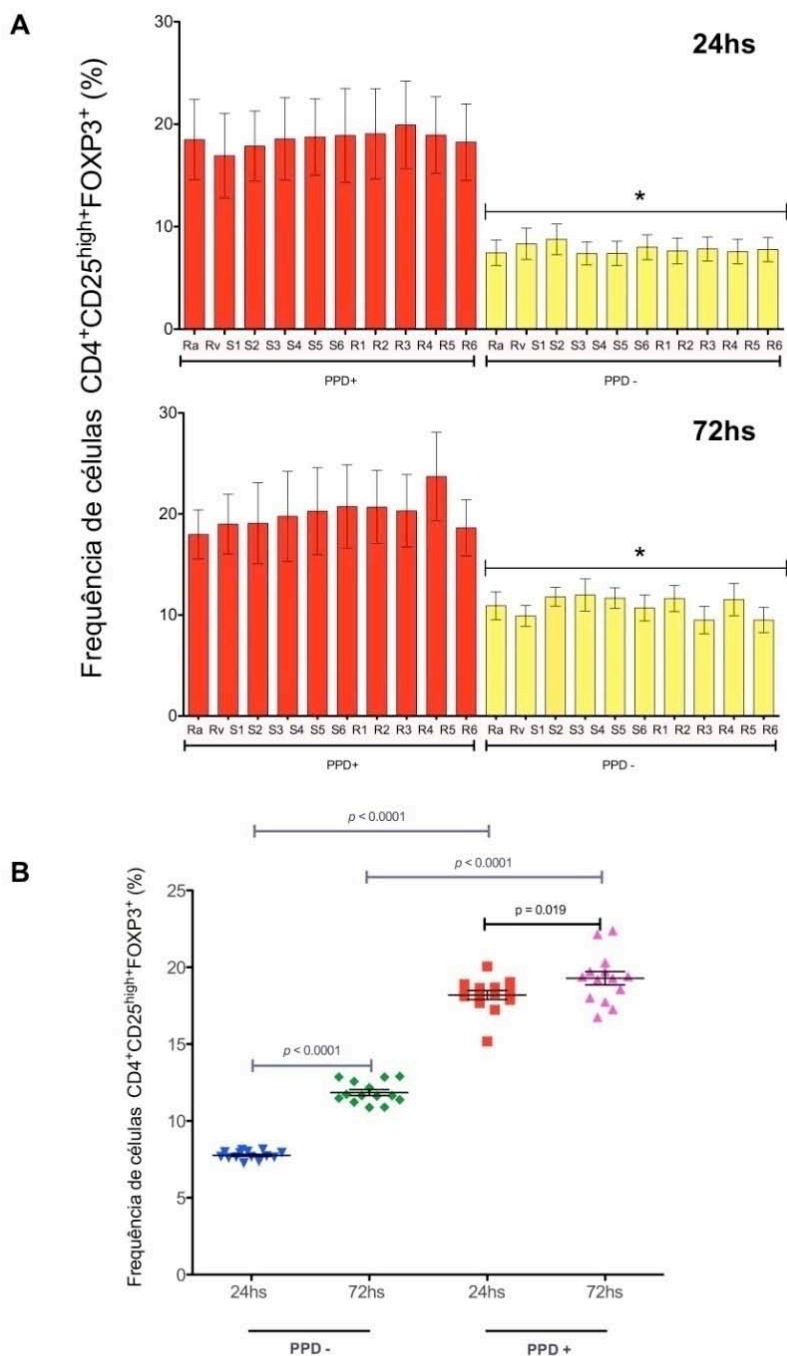


Figura 10. A) Frequência de células $CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+$ em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- estimuladas com isolados sensíveis (S1, S2, S3, S4, S5 e S6), com isolados multidroga resistentes (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) e com as cepas controle H37Ra e H37Rv nos tempos de 24hs e 72hs. B) Frequência de células $CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+$ em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com isolados/cepas de Mtb em 24hs e 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média do percentual de células e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.5. Capacidade microbica dos indivíduos PPD+ e PPD- em culturas de sangue total

Com o objetivo de investigar se a diferença na frequência de células Treg observada entre os grupos PPD+ e PPD- poderia afetar de alguma forma a resposta microbica desses indivíduos, a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) dos isolados R e S e das cepas padrão H37Ra e H37Rv em culturas de sangue total foram avaliadas e comparadas através de um ensaio microbica em sangue total (*whole blood killing assay*). Para tal, selecionamos um isolado sensível à droga (S1) e um resistente (R6), geneticamente distintos, dentre os 12 isolados estudados. O isolado S1 foi escolhido por se tratar de um isolado que, apesar de sua sensibilidade às drogas, apresenta uma virulência elevada e o isolado R6 porque, além de sua resistência às drogas, é um isolado de uma cepa de alta virulência (família Beijing). Neste experimento, foram utilizadas amostras de 6 indivíduos PPD+ e 6 PPD-.

O número de unidades formadoras de colônia (UFCs) foi quantificado às 4hs e 72hs pós-exposição das culturas aos isolados/cepas. Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 11.

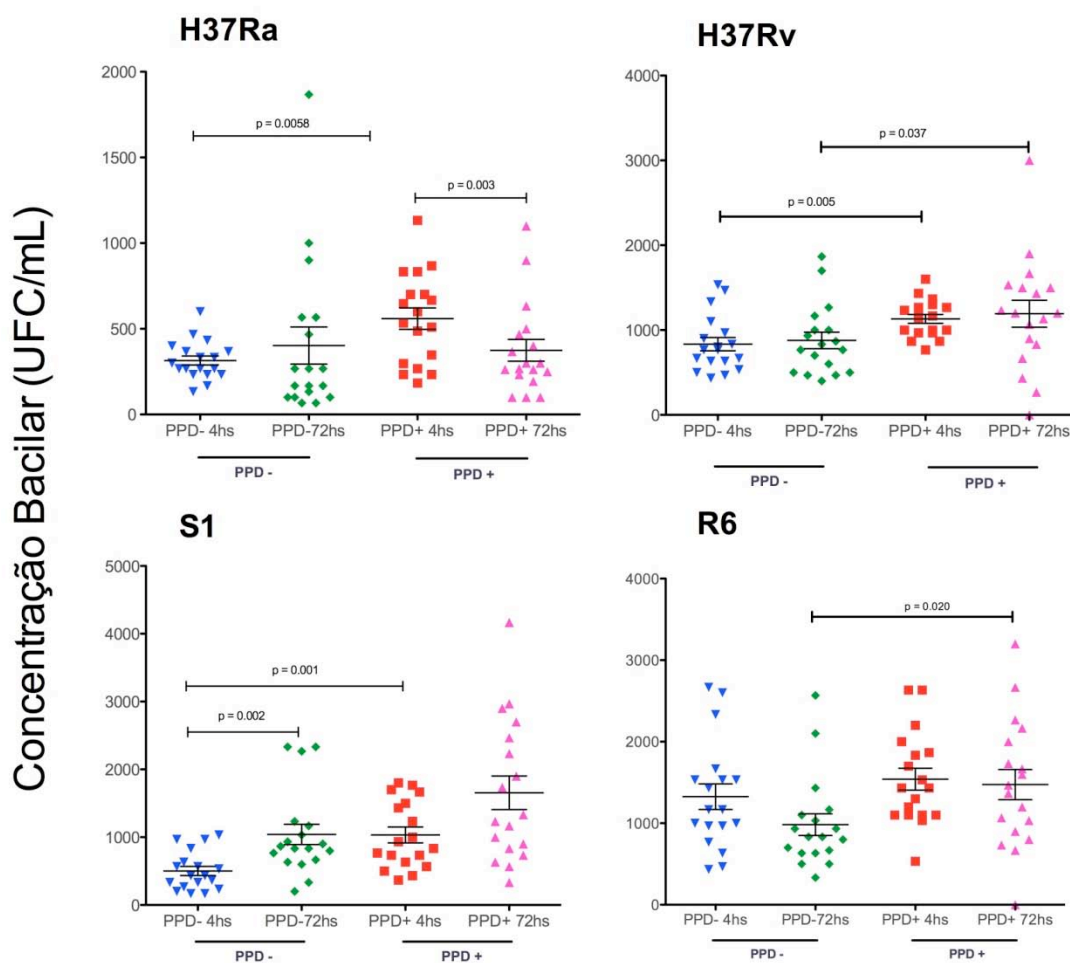


Figura 11. Capacidade microbicida em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD-. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

A concentração bacilar, representada por UFC/mL, dos isolados S1 e R6, bem como das cepas padrão foi significativamente distinta quando os grupos PPD+ e PPD- foram comparados (Figura 11). O número de UFCs para as cepas H37Ra, H37Rv e o isolado S1 foi significativamente maior no grupo PPD+ após 4 horas de exposição quando comparados aos resultados obtidos para estas cepas no grupo PPD-. Essa diferença só foi observada para o isolado R6 (resistente aos fármacos) após 72 horas de infecção (Figura 11).

Paralelamente à quantificação de UFCs, calculamos também a razão da contagem nos dois tempos de incubação (4h/72h) para obtenção do efeito microbicida relativo. Esses dados são apresentados na figura 12. A análise desses resultados revelou que, entre os indivíduos PPD+, o efeito microbicida mais intenso foi observado para a cepa

H37Ra e o de menor intensidade para o isolado S1. No grupo PPD- o efeito microbicida mais intenso foi observado para o isolado R6 e de menor intensidade contra o isolado S1, sugerindo que apesar de ser sensível às drogas, o isolado S1 apresenta uma resistência ao efeito microbicida tanto de indivíduos PPD+ quanto dos PPD-. Já o isolado R6 (isolado da cepa Beijing), apesar de ser um isolado virulento e resistente às drogas foi melhor controlado (efeito microbicida) por indivíduos PPD- do que pelos PPD+ (Figura 12).

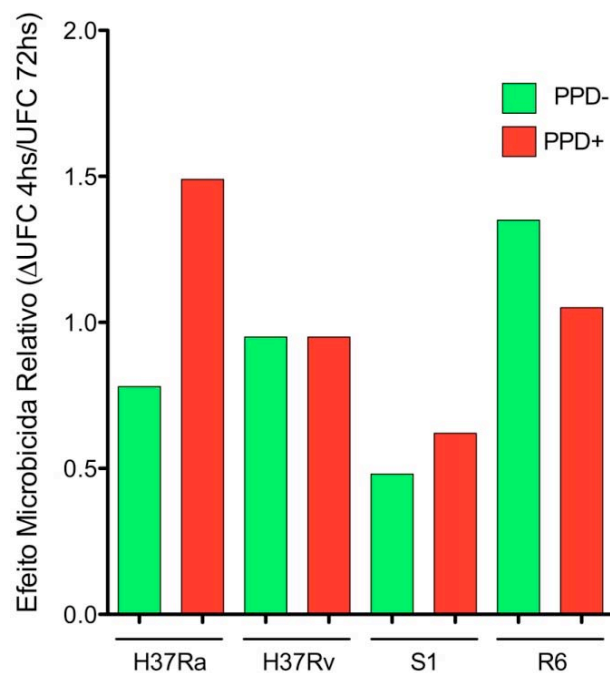


Figura 12. Efeito microbicida relativo nas culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com as cepas controle H37Ra, H37Rv e com os isolados S1 e R6. Os resultados estão expressos na forma de razão (média da contagem de UFCs em 4hs/média da contagem de UFCs em 72hs).

4.6. Atividade fagocitária dos macrófagos em culturas infectadas com isolados de *M. tuberculosis*

Considerando que o aumento da proliferação dos isolados observado em culturas do grupo PPD+ (especialmente com 4hs de infecção) poderia ser devido a um aumento na atividade fagocítica de seus macrófagos, culturas de macrófagos diferenciados a partir de amostras de sangue total de indivíduos PPD+ (n=3) e PPD- (n=3) foram infectados com os isolados S1 e R6 e o número de células infectadas quantificado após 2hs e 4hs de exposição. Foram considerados infectados os macrófagos que continham bacilos em seu interior (Figura 13). Os dados são apresentados na figura 14.

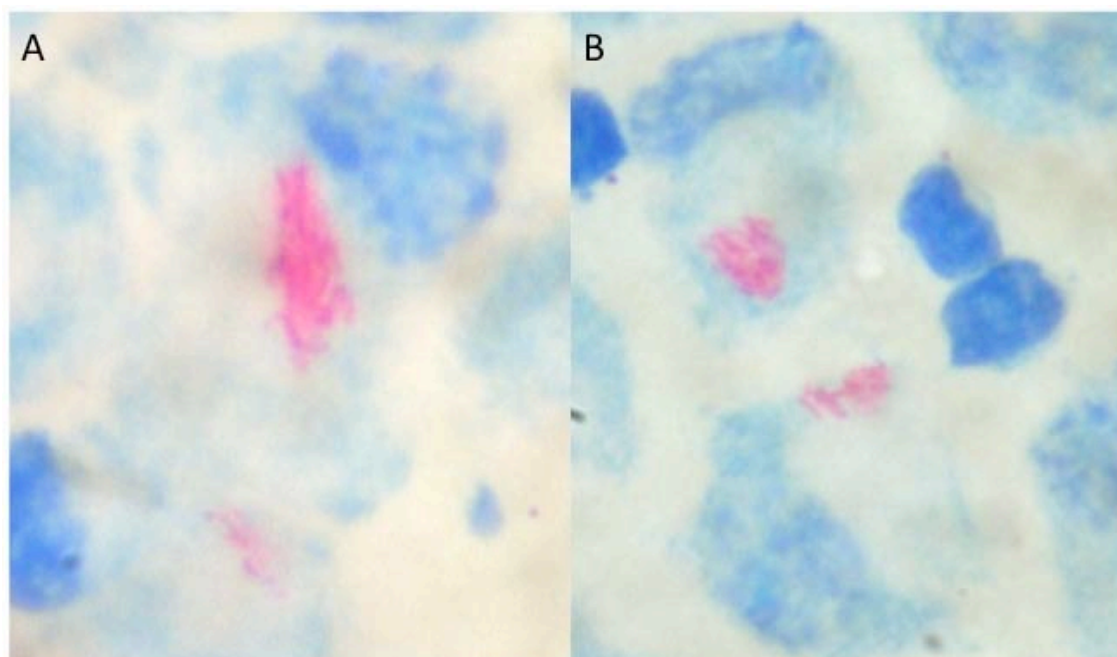


Figura 13. Imagem ao microscópio óptico (objetiva 100x) de macrófagos de indivíduos A) PPD+ e B) PPD- contendo bacilos em seu interior. As lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl Neelsen.

A análise dos resultados revelou que com 2hs de infecção o número de macrófagos infectados pelo isolado S1 era significativamente maior nas amostras de indivíduos PPD+ quando comparadas aos PPD-, porém essa diferença desaparecia com 4hs de exposição. Já o número de macrófagos infectados pelo isolado R6 foi semelhante entre os grupos PPD+ e PPD- nos dois tempos analisados.

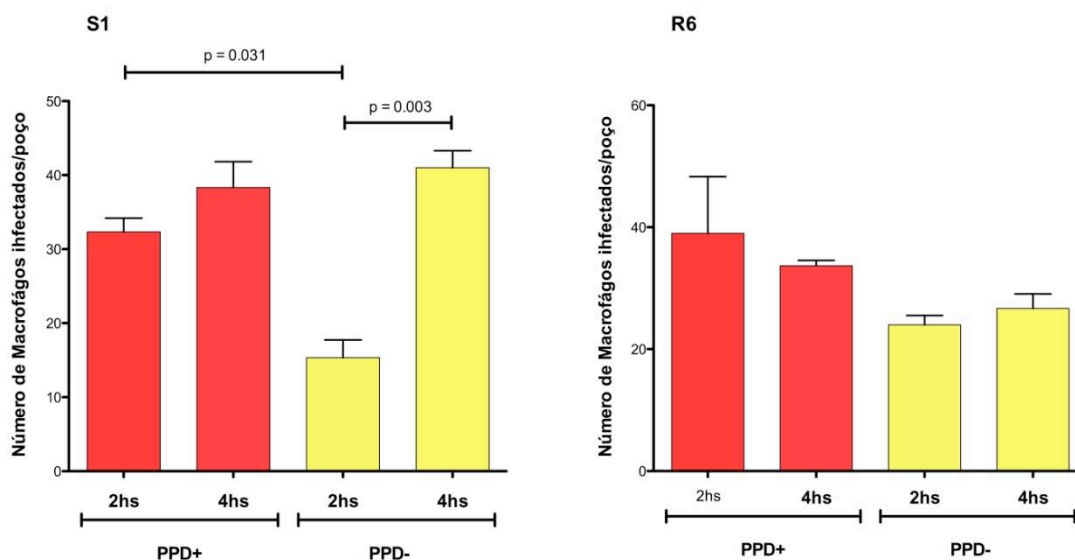


Figura 14. Avaliação da fagocitose em culturas de macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de amostras de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com os isolados de Mtb S1 e R6 com 2hs e 4hs de estimulação. Os resultados estão expressos em número absoluto de macrófagos contendo bacilos/poço da lâmina e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.7. Dosagem da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos em culturas de sangue total infectadas com isolados de *M. tuberculosis*

Como diferenças na resposta microbicida contra os isolados S1 e R6 foram observadas em culturas dos grupos PPD- e PPD+, a concentração de óxido nítrico (NO) nos sobrenadante das culturas de sangue total após 72hs de incubação foram avaliadas como um indicador alternativo do estado de ativação dos macrófagos. Para este experimento utilizamos amostras de sangue de 6 indivíduos PPD+ e 6 indivíduos PPD-, seus resultados são exibidos na figura 15.

Os níveis de NO encontrados no sobrenadante de cultura do grupo PPD+ não variaram frente as cepas/isolados utilizados na infecção (Figura 15). Por outro lado, quando os níveis de NO foram avaliados em sobrenadante de cultura de indivíduos PPD- os isolados S1 e R6 induziram níveis 2-3 vezes maiores do que os observados para as cepas padrão H37Ra e H37Rv (Figura 15). Apesar de não serem significativos estes dados sugerem que indivíduos PPD- possam apresentar uma atividade microbicida maior do que os PPD+.

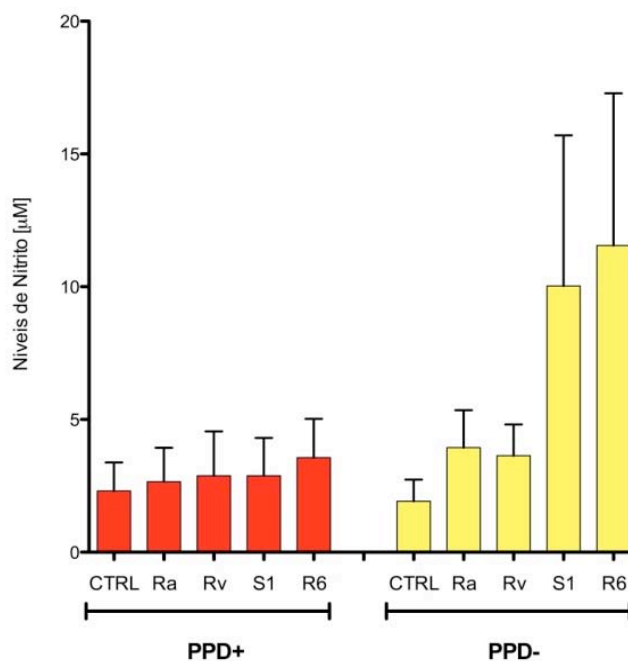


Figura 15. Níveis de óxido nítrico (μM) em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com os isolados S1 ou R6, com as cepas controle H37Ra ou H37Rv e controle não infectado com 72hs de incubação. Os resultados estão expressos em média da concentração de NO (μM) e desvio padrão para cada grupo analisado.

4.8. Dosagem dos níveis de citocinas em culturas de CMSP

Considerando que os níveis de NO encontrados poderiam estar associados a alterações na produção de citocinas, a concentração de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α foi determinada em sobrenadantes de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- após infecção com os isolados S1 e R6. Para a condução deste experimento utilizamos amostras de 5 indivíduos PPD+ e 5 indivíduos PPD-.

Dados apresentados na figura 16 demonstram que os níveis de IL-4, IL-5, e IL-10 não variaram significativamente nos grupos estudados. Por outro lado, convém destacar que as culturas de amostras de CMSP de indivíduos PPD+ quando estimuladas com o isolado S1 mostram uma tendência de aumento na produção de IL-2. Estes dados mostram que diferenças na resistência ou susceptibilidade às drogas não afetam significativamente a produção de citocinas.

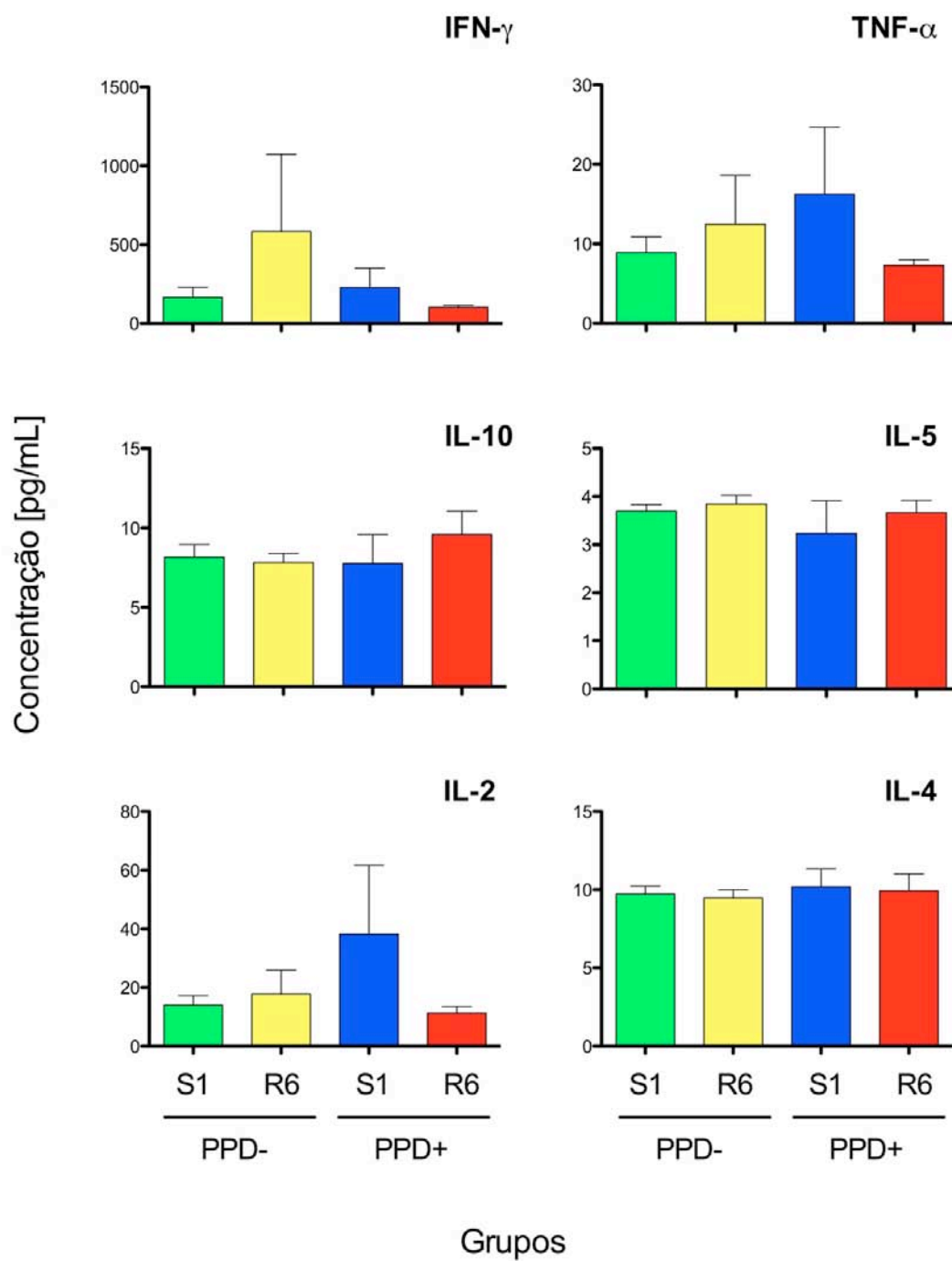


Figura 16. Níveis de citocinas em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com os isolados S1 e R6 com 72hs de infecção. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

4.9. Capacidade microbicida de indivíduos PPD+ e PPD- em culturas de CMSP realizadas na presença e ausência de células T reguladoras

Com o objetivo de investigarmos se as diferenças observadas na proliferação de Mtb em indivíduos PPD+ eram provocadas pelo aumento na frequência de células T reguladoras, culturas de CMSP de indivíduos PPD+ (n=5) e indivíduos PPD- (n=5) infectadas com os isolados S1 e R6 foram realizadas na presença e ausência (depleção) das células T reguladoras. Foi feita a quantificação de UFCs nessas culturas e seus resultados são exibidos nas figuras 17 e 18.

Quando comparamos o número de UFCs em culturas de CMSP na presença ou ausência de células T reguladoras em um mesmo grupo de indivíduos (PPD+ ou PPD-) (Figura 17) observamos que, no grupo PPD+, a contagem de UFCs dos isolados S1 e R6 diminuiu de 4hs para 72hs após a depleção de células Treg, sugerindo que a presença destas células poderia estar associada à menor atividade microbicida observada nesse grupo. Por outro lado, a contagem de UFCs dos isolados S1 e R6 em culturas do grupo PPD- diminuiu abruptamente em 4hs e se manteve baixa até 72hs, independente da presença ou ausência de células Treg.

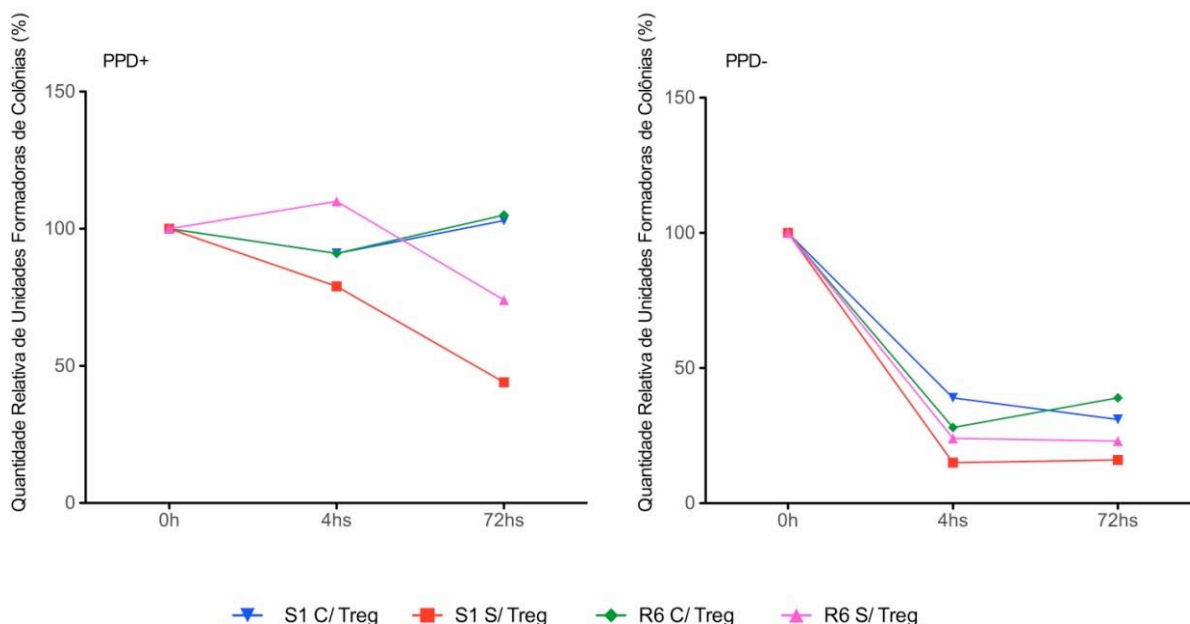


Figura 17. Cinética da capacidade microbicida em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de células Treg com 0h, 4hs e 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média da quantidade relativa de UFCs em porcentagem.

Ao concentrarmos nossa análise no período de 72hs pós-infecção (Figura18) observamos que a depleção de células T reguladoras aumentou significativamente a atividade microbicida de indivíduos do grupo PPD+ tanto para o isolado S1 quanto para o R6, aqui representadas pela diminuição no número de UFCs. No grupo PPD-, a depleção de células Treg não produziu uma diferença significativa na atividade microbicida contra o isolado S1, porém um aumento significativo ($p=0,018$) na atividade microbicida contra o isolado R6 foi observado. Esses dados sugerem que a presença de células Treg afeta negativamente a atividade microbicida contra micobactérias tanto no grupo PPD- quanto no PPD+, sendo que neste último grupo a depleção destas células levou a uma diminuição altamente significativa para o isolado S1 ($p=0.0011$) e para o R6 ($p=0.002$).

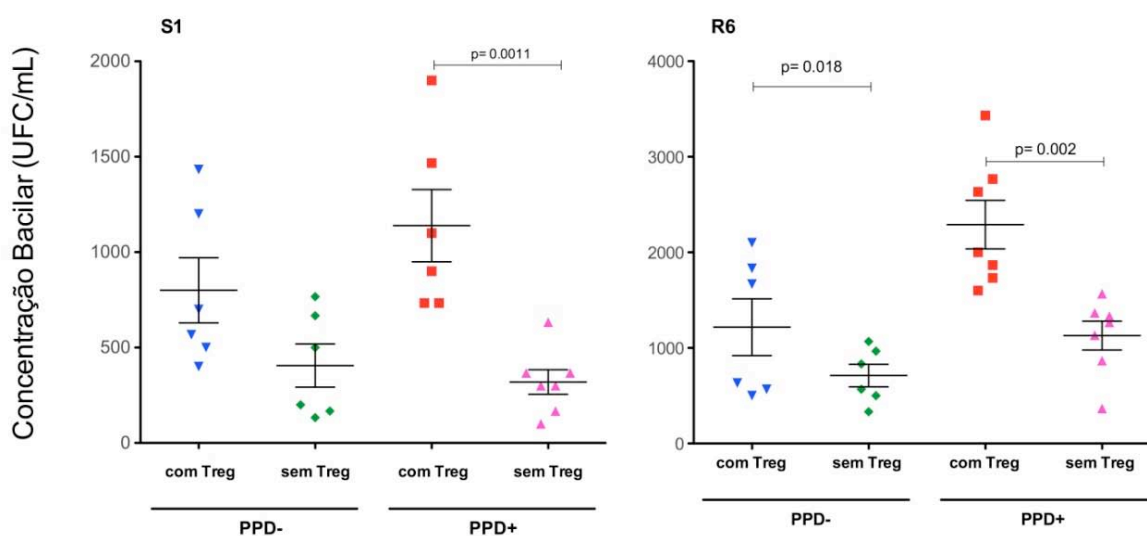


Figura 18. Contagem de UFCs em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de células Treg infectadas com os isolados S1 e R6 com 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média da concentração de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

A razão da contagem de UFCs (4hs/72hs) mostra que a depleção destas células aumentou o efeito microbicida nas culturas de CMSP de indivíduos PPD+ contra os isolados S1 e R6, como pode ser observado na figura 19.

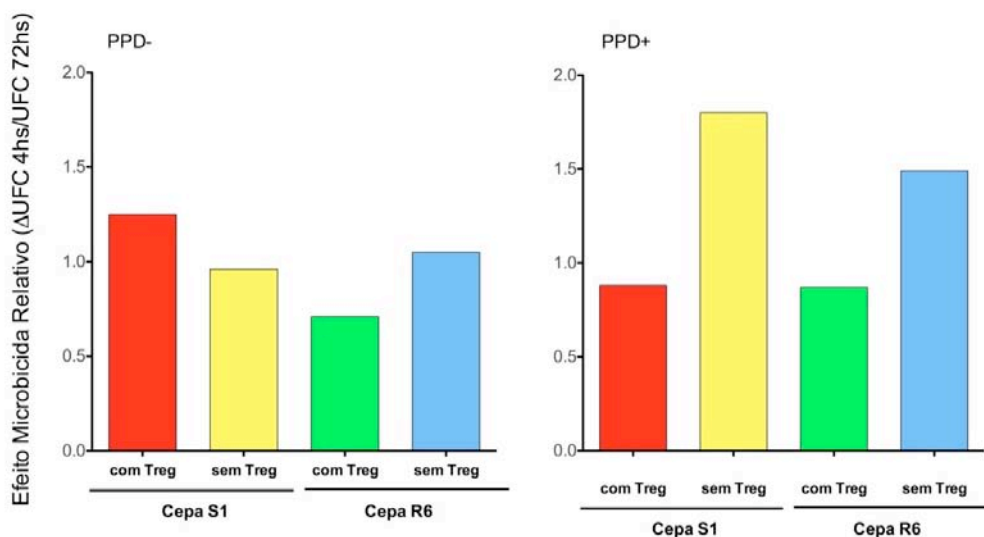


Figura 19. Efeito microbicida relativo em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de células Treg infectadas com os isolados S1 e R6. Os resultados estão expressos na forma de razão (média da contagem de UFCs em 4hs/média da contagem de UFCs em 72hs).

4.10. Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP realizadas na presença e na ausência de células T reguladoras infectadas com isolados de *M. tuberculosis*

Após demonstrarmos que a depleção de células T reguladoras aumentava a atividade microbicida em culturas de CMSP de indivíduos PPD+, avaliamos seu impacto na produção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α em sobrenadantes de culturas de CMSP na presença e ausência de Tregs. Neste experimento foram utilizadas amostras de indivíduos PPD+ (n=5) e indivíduos PPD- (n=5). Como esperado, a depleção de células T reguladoras levou a um aumento significativo da produção de IL-2 e TNF- α nos sobrenadantes de cultura de ambos os grupos (Figura 20). Os níveis de IFN- γ aumentaram no sobrenadante das culturas depletadas somente no grupo PPD+. Paralelamente, observamos um aumento significativo nos níveis de IL-10 pós-depleção das células T reguladoras, sugerindo que, neste caso, essa citocina possa não ser produzida diretamente pelas Tregs. Apesar da elevação na produção de citocinas pós-depleção, os níveis de IL-2, IL-10, IFN- γ e TNF- α em culturas infectadas com o isolado S1 não foram diferente dos níveis observados para o isolado R6. Todavia, a depleção de células Tregs em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ infectadas com o isolado S1 induziu um aumento 2-3 maior na produção de IFN- γ e IL-2 quando comparado às culturas infectadas com R6.

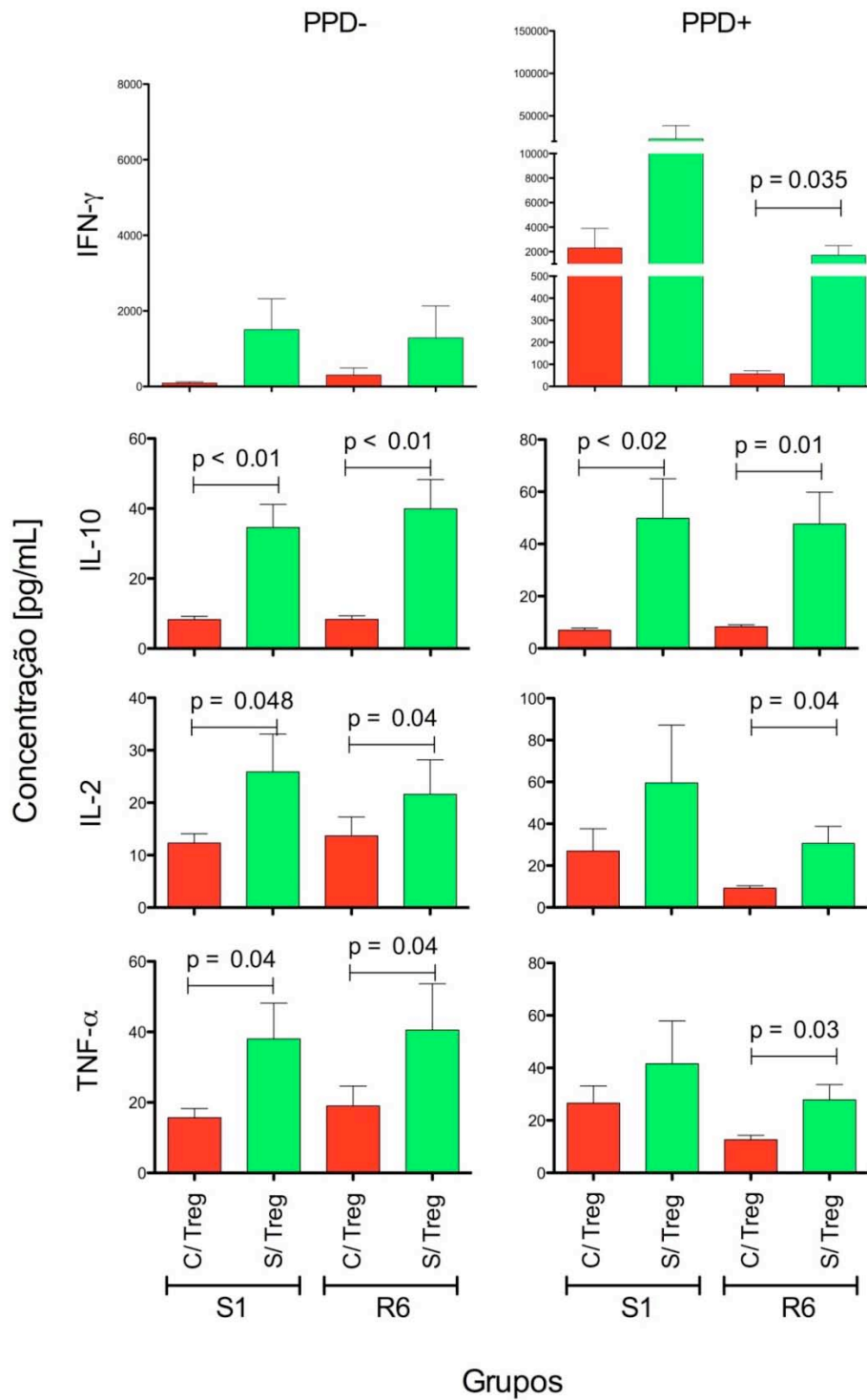


Figura 20. Níveis de citocinas nas culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- na presença ou ausência de Treg infectadas com os isolados S1 e R6 com 72hs de estimulação. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A resposta imune celular, particularmente aquela mediada por linfócitos T, tem um papel central no controle da replicação do *M. tuberculosis*. Porém, a causa pela qual alguns indivíduos são mais susceptíveis à tuberculose do que outros ainda não foi totalmente elucidada. A identificação de fatores que diferenciem esses dois grupos de indivíduos é importante para elucidação dessa resposta e dos seus mecanismos efetores bem como para definir uma estratégia de prevenção mais eficaz.

O fato de que apenas 10% a 30% dos indivíduos que entram em contato com o bacilo se tornam infectados sugere que alguns indivíduos são capazes de eliminar a infecção pelo *M. tuberculosis* rapidamente. Uma forma de diferenciar esses indivíduos é por meio do teste intradérmico utilizando o PPD, ao qual permanecem negativos (não-reativos). Outros indivíduos conseguem controlar a infecção, porém se tornam sensíveis a antígenos micobacterianos sendo, portanto, positivos ao teste com PPD. Desta forma, características individuais podem ser fatores determinantes de susceptibilidade ou resistência à tuberculose.

Um possível fator de susceptibilidade à tuberculose é a diminuição na produção de citocinas do tipo Th1, especialmente o IFN- γ (TING et al, 1999; LI and WU, 2008; HIRSCH et al, 1999), e o aumento na produção de citocinas imunomoduladoras, como a IL-10 e TGF- β (GONG et al, 1996; TOOSI and ELLNER, 1998) após infecção por Mtb. A atuação dessas citocinas tem sido amplamente descrita pela literatura tanto na tuberculose quanto em outras doenças infecciosas.

Além disso, alguns trabalhos têm focado na produção de citocinas em culturas com diferentes isolados infectantes, como o realizado por Fujiwara et al que demonstrou um aumento na concentração de IL-10 em sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com isolados de *M. tuberculosis* multidroga resistentes quando comparadas às culturas estimuladas com isolados sensíveis (FUJIWARA et al, 1996). Outro estudo revelou que isolados clínicos de Mtb sensíveis aos fármacos sinalizaram melhor a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) quando comparados com isolados MDR em culturas em macrófagos diferenciados de células THP-1 (linhagem monocítica humana) (COUTO J, 2008).

Tendo como base os dados supracitados, primeiramente, avaliamos a produção de citocinas no sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com isolados sensíveis ou resistentes aos fármacos anti-TB. O resultado encontrado não mostrou diferença significativa entre os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL2 nos sobrenadantes das culturas infectadas, independente do isolado ou do grupo de indivíduos estudados. Essa ausência de significância observada no nosso estudo está em desacordo com os trabalhos anteriormente citados (FUJIWARA et al, 1996; COUTO J, 2008). Uma possível explicação se deve ao fato das diferenças estatísticas reportadas por Fujiwara terem sido observadas apenas quando sobrenadantes de cultura com 3 dias de incubação foram avaliadas, não tendo sido encontrado em culturas incubadas por 24hs ou 5 dias (FUJIWARA et al, 1996). Apesar de não termos encontrado uma diferença significativa entre os isolados resistentes ou sensíveis, foi possível notar que os isolados S1, S3, S5 e R3 levaram a um aumento nos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10 no grupo PPD-. Essa observação sugere que o estado reacional ao PPD poderia ser o fator responsável por alterações na produção de citocinas e não o perfil de resistência dos isolados.

A presença da subpopulação de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, ou células T reguladoras, é um elemento de destaque na susceptibilidade à TB. O envolvimento destas células no controle de respostas auto-ímmunes já foi anteriormente comprovado, entretanto o papel das células reguladoras nas doenças infecciosas continua sendo de grande interesse no meio científico. Na TB, ainda não está claro se a expansão dessas células é a causa ou a consequência do desenvolvimento da doença. Provavelmente, elas são expandidas como uma resposta adaptativa do hospedeiro para limitar a reação inflamatória e consequentemente o dano tecidual induzido durante a resposta imune contra a micobactéria. Porém, é possível que células Tregs sejam expandidas em resposta à infecção por *M. tuberculosis* através do reconhecimento de produtos micobacterianos específicos.

O fato é que estudos têm revelado que a infecção pelo Mtb aumenta a frequência das células Tregs sendo acompanhada da produção de respostas antiinflamatórias ou imunossupressoras permitindo, assim, a permanência da micobactéria no hospedeiro infectado (GUYOT-REVOL et al, 2006; RIBEIRO-RODRIGUES et al, 2006, CHEN et al, 2007).

Refletindo sobre esse cenário foi avaliada então a frequência de células T $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$ (Treg) em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com isolados clínicos sensíveis e multidroga resistentes. Quando indivíduos PPD- foram comparados aos PPD+, observamos que os dois grupos diferiam significativamente quanto à frequência das células T reguladoras. Nossos resultados revelam que os indivíduos PPD+ apresentam uma elevação na frequência de linfócitos T reguladores, tanto nas culturas de 24hs quanto nas de 72hs, quando comparadas ao grupo de indivíduos PPD-. Recentemente, Garg e cols demonstraram que o Mtb promove uma expansão de células T reguladoras, dependente de Man-LAM (manose-lipoarabinomanana) e PGE2 (prostaglandina E2), a partir de CMSP de indivíduos PPD+, o que não ocorre em indivíduos PPD- (GARG et al, 2008). Esse dado corrobora nossos resultados e ambos têm relevância para as manifestações clínicas da infecção por Mtb, visto que em pacientes com uma produção de $\text{IFN-}\gamma$ reduzida em resposta ao Mtb (HIRSCH et al, 1999), o número de Tregs é ainda maior do que em indivíduos PPD+ (GUYOT-REVOL et al, 2006; RIBEIRO-RODRIGUES et al, 2006).

Uma possível justificativa para o aumento da frequência de células Tregs nos indivíduos PPD+ com relação aos PPD- foi demonstrada no estudo de Vukmanovic-Stejic e cols (VUKMANOVIC-STEJIC et al, 2006) que revelou uma proximidade clonal entre células de memória expandidas e células T reguladoras $CD4^+$, indicando que elas são provavelmente derivadas da mesma população precursora e sugerindo que a expansão de células T $CD4^+$ por algum estímulo específico, como o Mtb, poderia induzir células T reguladoras $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$ específicas para o Mtb. Além disso, quando avaliada a expressão de CD45RO (marcador de células T de memória) em células $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$ constatou-se que mais de 95% dessas células eram $CD45RO^+$ (MARIN et al, 2010).

Isso nos permite supor que a especificidade das células T $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$ de memória para Mtb presente em indivíduos PPD positivos pode determinar a capacidade de conversão periférica dessas células em linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$.

A possibilidade de células T reguladoras serem realmente antígeno-específicas pode explicar a grande variação na eficácia da vacina BCG, sendo mais eficiente nas regiões frias e funcionando pouco nos países tropicais, nos quais o nível de exposição às micobactérias ambientais é maior. Por isso é importante uma investigação sobre a

possibilidade da BCG e das micobactérias ambientais ativarem e manterem populações de células Treg, e conseqüentemente controlarem a resposta imune contra a TB, visto que o Mtb compartilha vários antígenos com as micobactérias ambientais e também com a BCG. Além disso, a compreensão de mecanismos que possa anular seletivamente o papel dessas células T reguladoras convertidas periféricamente poderia trazer algum benefício, especialmente para o desenvolvimento de uma vacina mais efetiva para a tuberculose.

Uma possível explicação para a ineficácia parcial da BCG foi revelado por Verver e cols (VERVER et al, 2005) os quais demonstraram que pessoas tratadas com sucesso para TB apresentam um risco maior de adoecer novamente por essa doença quando comparados à população em geral, ao contrário do que ocorre em outras doenças bacterianas nas quais as pessoas que já foram doentes e tratadas com sucesso desenvolvem uma resposta imune adquirida (de memória) e se tornam mais protegidas do que pessoas que nunca tiveram a doença.

A reunião desses achados sugere que a BCG, ao invés de proteger, poderia tornar os indivíduos vacinados mais susceptíveis à TB ao sensibilizá-los e permitir a conversão periférica das células T de memória em células T reguladoras.

Em nosso estudo foi também considerada a perspectiva da micobactéria. Muitos relatos apresentam evidências de que o *M. tuberculosis* consegue burlar mecanismos microbicidas os quais deveriam ser eficientes para eliminação de microorganismos. Quanto mais virulenta a cepa de micobactéria, menor sua capacidade em estimular a secreção de citocinas, como o TNF- α , por macrófagos (MENDELSON et al, 2005) e de induzir a apoptose de macrófagos (RIOS-BARRERA et al, 2006). Além disso, o Mtb exibe uma capacidade de modular negativamente a expressão de moléculas co-estimuladoras (RAJAVELU and DAS, 2008), de interferir na função das APC (NOSS et al, 2001), de interferir ou bloquear a transcrição de genes relacionados à capacidade microbicida dos macrófagos (FORTUNE et al, 2004), de suprir a resposta proliferativa de linfócitos (RAJAVELU and DAS, 2008) e induzir apoptose de linfócitos (RIOS-BARRERA et al, 2006).

Nós procuramos mostrar que, além do hospedeiro, o *background* genético do Mtb e seu perfil de resistência às drogas também poderiam influenciar negativamente alguns mecanismos da resposta imune. A maioria dos microorganismos tenta evitar sua eliminação pela resposta imune do hospedeiro para garantir sua transmissão. Assim, durante a infecção, mecanismos de regulação da resposta imunológica podem resultar

de uma resposta do hospedeiro ao agente infeccioso como uma tentativa de manter ou recuperar a homeostasia, podendo também ser ativamente induzido pelo patógeno com o intuito de favorecer sua sobrevivência. Essa forma de regulação/evasão pode ser alcançada diretamente pela indução de citocinas reguladoras no hospedeiro ou indiretamente pela geração de células reguladoras.

Porém, nossos resultados comparando a frequência de células $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ em culturas de sangue total infectadas com isolados de *Mtb* multidroga resistentes ou com isolados de *Mtb* sensíveis não revelou diferenças significativas. Esse dado corrobora os dados do trabalho de Palaci e cols (PALACI M, 2001), os quais utilizaram os mesmos isolados clínicos e avaliaram a capacidade de multiplicação intracelular destes em culturas de macrófagos. Palaci e cols não encontraram diferença significativa no índice de multiplicação intracelular de isolados sensíveis e multidroga resistentes. Porém, estes autores destacaram o isolado S1 por sua alta capacidade proliferativa e o R6 pelo seu genótipo de cepa altamente virulenta (família Beijing), ambos utilizados nesse estudo.

A taxa de proliferação do *Mtb* em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- foi utilizada para investigarmos se a diferença na frequência de células Treg entre esses dois grupos poderia afetar a resposta microbicida desses indivíduos contra dois isolados (S1 e R6) e duas cepas padrão (H37Ra e H37Rv). Como observado anteriormente por Palaci e cols (PALACI M, 2001), nenhuma diferença significativa foi observada entre os isolados/cepas, com exceção do isolado S1, o qual se destacou por sua alta taxa proliferativa evidenciada no grupo PPD-.

Porém, ao compararmos os grupos PPD+ e PPD- diferenças significativas na resposta microbicida foram encontradas, o grupo PPD+ apresentou resposta microbicida reduzida 4hs pós-infecção com as cepas H37Ra e H37Rv e com o isolado S1 quando comparadas as encontradas no grupo PPD-, já para o isolado R6 essa diferença só foi observada 72hs após a infecção.

Esses dados nos levaram a supor que a menor atividade microbicida, observada com 4hs pós-infecção no grupo PPD+ quando comparada ao grupo PPD-, pode ser causada por uma atividade fagocítica elevada por parte dos macrófagos dos indivíduos PPD+, ou por uma atividade microbicida mais vigorosa e efetiva no grupo PPD-. Porém, dados do experimento de cinética da fagocitose, no qual culturas de macrófagos diferenciados foram infectadas com os isolados S1 e R6 (MOI 10) e avaliados nos

tempos de 2hs e 4hs pós-infecção, demonstraram que não houve diferença significativa na fagocitose do isolado S1 e R6 4hs pós-infecção.

Com base nesses dados e nos dados anteriores podemos sugerir que a menor capacidade microbicida observada no grupo de indivíduos PPD+ pode ser fruto da maior frequência de células T reguladoras observada no grupo PPD+. Células Tregs poderiam afetar negativamente a resposta microbicida dos indivíduos PPD+ através de diversos mecanismos como, por exemplo, através da produção de citocinas imunomoduladoras (ASSEMAN et al, 1999; MANN et al, 2007; SCHUMACHER et al, 2007; FAHLEN et al, 2005), por citólise (GROSSMAN et al, 2004) e de distúrbio celulares levando a um aumento no consumo local de IL-2 (PANDIYAN et al, 2007).

Sabemos que a ativação de macrófagos via IFN- γ e TNF- α , estimula a produção de iNOS2 (*Inducible Nitric Oxide Synthase-2*) e ROIs (*Reactive Oxygen Intermediates*), os quais apresentam uma atividade microbicida potente contra Mtb (BERRINGTON and HAWN, 2007; DING et al, 1988; AXELROD et al, 2008). Em nosso estudo, o estado de ativação dos macrófagos de indivíduos PPD+ e PPD- foi avaliado através da dosagem de óxido nítrico (NO) no sobrenadante das culturas de sangue total após 72hs de infecção.

Mesmo não sendo significativos, dados deste experimento demonstram que a infecção de macrófagos do grupo PPD- pelos isolados S1 e R6 induziram níveis de NO 2-3 vezes maiores do que os observados para as cepas padrão H37Ra e H37Rv no mesmo grupo e de 2-3 vezes maior do que os níveis observados no grupo PPD+, independente da origem do isolado/cepa. Nossos dados sugerem que células dos indivíduos PPD- apresentam uma atividade microbicida mais vigorosa quando comparadas com o grupo PPD+. Esses resultados podem estar também relacionados ao aumento na frequência de células T reguladoras encontrada nos indivíduos PPD+, as quais poderiam atuar de forma negativa, diminuindo a ativação de macrófagos e, por conseguinte, a produção de NO.

Como a síntese e liberação de NO estão associadas a produção de determinadas citocinas, a concentração de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α foi determinada no sobrenadante de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- após 72hs de infecção com os isolados S1 e R6. Níveis elevados de IFN- γ encontrados em culturas de CMSP de indivíduos PPD- infectadas com R6 coincidem com a elevação na concentração de NO. Um aumento na produção de IL-2 em culturas de CMSP de indivíduos PPD+ infectadas com S1 foi observado e sugere que o mecanismo de

controle/inibição da resposta microbicida utilizado pelas células T reguladoras, encontradas em maior frequência nesse grupo, possa não ser a privação da citocina IL-2.

Considerando que todas as evidências por nós encontradas durante a execução deste projeto apontavam para uma participação importante das células Tregs na diminuição da atividade microbicida dos indivíduos PPD+, decidimos investigar qual seria o efeito da remoção destas células nas amostras testadas. Culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- das quais foram depletadas as células T CD4⁺CD25⁺ foram infectadas com os isolados de Mtb. A depleção de células Tregs levou a uma diminuição significativa da proliferação de ambos os isolados utilizados (S1 e R6) em ambos os grupos com um impacto muito expressivo em culturas de CMSP de indivíduos PPD+. Esse aumento na resposta microbicida do grupo PPD+ nas culturas de CMSP na ausência das células T CD4⁺CD25⁺ confirmou nossa suspeita de que as células T reguladoras afetariam negativamente a resposta imune nesse grupo de indivíduos em infecções por *M. tuberculosis*.

Paralelamente, avaliamos, também, o impacto da depleção de células T CD4⁺CD25⁺ na produção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α em sobrenadante de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD-. Como esperado, a ausência de células T reguladoras resultou no aumento significativo da produção de IL-2 e TNF- α nos sobrenadantes de culturas de ambos os grupos, e de IFN- γ somente no grupo PPD+. Um aumento nos níveis de IL-10 nos sobrenadantes pós-depleção das Tregs foi também observado, sugerindo que essa citocina talvez não seja produzida por essas células, portanto que o mecanismo de modulação da resposta utilizado pelas Tregs neste caso não é mediado pela IL-10. Resultados similares aos nossos foram reportados anteriormente por Chen e cols (CHEN et al, 2007) os quais mostraram que um aumento na frequência de células T reguladoras durante a tuberculose afeta negativamente a produção tanto de IFN- γ quanto da IL-10. Outro trabalho sobre o efeito de células Treg na produção de IFN- γ revelou que culturas de CMSP de indivíduos com TB ativa e indivíduos PPD+ estimuladas com os antígenos ESAT-6, CFP-10 e PPD aumentaram a frequência de células produtoras de IFN- γ na ausência de Treg (MARIN et al, 2010). Além disso, nesse mesmo estudo foi demonstrado que a modulação exercida pelas Tregs na frequência de células produtoras de IFN- γ não era dependente de IL-10. Apesar do estímulo utilizado nesse trabalho (antígenos) ser

diferente do utilizado no nosso estudo (Mtb viável), esses dados corroboram nossos dados.

Em suma, acreditamos que indivíduos positivos para o teste intradérmico com PPD possuem frequência de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) maior do que indivíduos PPD- e que essas células são convertidas em Tregs a partir de células T de memória antígeno-específicas para Mtb periféricamente, sendo classificadas como células T reguladoras induzidas. A presença dessa população celular afetaria negativamente a resposta imune dos indivíduos PPD+ levando a uma diminuição da atividade microbicida de macrófagos, permitindo assim a proliferação do bacilo. Acreditamos ainda que os mecanismos utilizados pelas células Tregs para modular negativamente a atividade microbicida seja independente de IL-10 e do distúrbio metabólico por consumo local de IL-2.

Dados obtidos em nosso estudo vão de encontro ao paradigma de que uma pessoa PPD+ seria mais resistente ao Mtb pelo fato de possuir uma resposta celular contra o bacilo (reação positiva ao PPD). Os dados aqui apresentados quando somados aos da literatura científica reforçam a hipótese de que a pré-exposição ao *M. tuberculosis* pode induzir células T reguladoras as quais teriam uma influência negativa na patogênese da tuberculose. Aparentemente, a presença das células T reguladoras específicas para o *M.tuberculosis* induziria um aumento na susceptibilidade do hospedeiro às infecções pelo bacilo, através do comprometimento da habilidade do hospedeiro em organizar uma resposta imune protetora contra essa infecção. Uma implicação prática, baseada nessa hipótese, é que a exposição prévia ao Mtb ou mesmo ao BCG, poderia induzir ou pelo menos estimular o aumento na frequência de células T reguladoras e que essas células causariam uma modulação imune negativa causando um aumento na susceptibilidade à infecção, como sugerido por Verver et al (VERVER et al, 2005).

O papel das células T reguladoras na TB latente ainda não está esclarecido e novos estudos são necessários para esclarecermos esse tópico. Um possível uso dessas células seria como biomarcadores preditivos para o desenvolvimento da TB ativa em indivíduos com alto risco, como contactantes de pacientes com tuberculose.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os resultados do nosso estudo mostraram que:

1. A frequência células T reguladoras $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ foi significativamente maior entre indivíduos positivos ao teste com PPD (PPD+) quando comparados a indivíduos negativos ao teste com PPD (PPD-).
2. O fenótipo dos isolados de Mtb quanto à resistência ou não aos fármacos, não afetou significativamente a frequência de células T reguladoras e os níveis de citocinas tanto no grupo PPD- quanto no PPD+.
3. A capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ e PPD- em culturas de sangue total foi significativamente maior no grupo PPD+ quando comparada ao grupo PPD-.
4. O estado reacional dos indivíduos ao PPD não afetou nem a capacidade fagocitária “*in vitro*” de macrófagos nem a produção de óxido nítrico (NO).
5. A depleção de células T $CD4^+CD25^+$ levou a uma menor contagem de UFCs e um maior nível de IL-2, TNF- α e IL-10 no sobrenadante das culturas de CMSP tanto no grupo PPD+ quanto no PPD-. E a um aumento no nível de IFN- γ no grupo PPD+.

CONCLUSÃO FINAL:

Dados obtidos em nosso estudo mostraram pela primeira vez que a pré-exposição ao *M. tuberculosis* pode induzir células T reguladoras específicas, as quais comprometem a habilidade do hospedeiro em organizar uma resposta imune protetora contra essa infecção, provocando um aumento na susceptibilidade do indivíduo PPD+ a infecções subsequentes.

Referências

6. REFERÊNCIAS

- ADEREM A and UNDERHILL DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; **17**:593–623.
- ALTARE F, DURANDY A, LAMMAS D, EMILE JF, LAMHAMEDI S, LE DEIST F, DRYSDALE P, JOUANGUY E, DÖFFINGER R, BERNAUDIN F, JEPSSON O, GOLLOB JA, MEINL E, SEGAL AW, FISCHER A, KUMARARATNE D, CASANOVA JL. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 1998; **280**:1432–5.
- ANDERSEN P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 1997; **45**:115–131.
- APOSTOLOU I and von BOEHMER H. In vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J Exp Med* 2004; **199**:1401-1408.
- APPELBERG R, ORME IM, PINTO DE SOUSA MI, SILVA MT. In vitro effects of interleukin-4 on interferon-gamma-induced macrophage activation. *Immunology* 1992; **76**:553–559.
- ASSEMAN C, MAUZE S, LEACH MW, COFFMAN RI, POWRIE F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; **190**:995-1004.
- ASTARIE-DEQUEKER C, N'DIAYE EN, LE C, RITTIG VMG, PRANDI J, MARIDONNEAU-PARINI I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect. Immun.* 1999; **67**:469–477.
- AXELROD S, OSCHKINAT H, ENDERS J, SCHLEGEL B, BRINKMANN V, KAUFMANN SH, HAAS A, SCHAIBLE UE. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol* 2008; **10**:1530-1545.
- BALCEWICZ-SABLINSKA MK, KEANE J, KORNFELD H, REMOLD HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J. Immunol.* 1998; **161**:2636–2641.
- BANHAM AH. Cell-surface IL-17 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol* 2006; **27**:541-544.

- BARNES PF, LU S, ABRAMS JS, WANG E, YAMAMURA M, MODLIN RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 1993; **61**:3482–3489.
- BELLAMY R, RUWENDE C, CORRAH T, MCADAM KP, THURSZ M, WHITTLE HC, HILL AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis.* 1999; **179**:721–4.
- BEN-ALI M, BARBOUCHE MR, BOUSNIA S, CHABBOU A, DELLAGI K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diag Laboratory Immunol.* 2004; **11**:625–6.
- BENSINGER SJ, BANDEIRA A, JORDAN MS, CATON AJ, LAUFER TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2001; **194**:427–438.
- BERGERON A, BONAY M, KAMBOUCHNER M, LECOSSIER D, RIQUET M, SOLER P, HANCE A, TAZI A. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J. Immunol.* 1997; **159**:3034–3043.
- BERRINGTON WR and HAWN TR. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 2007; **219**:167-186.
- BLOCH H. Studies on the virulence of tubercle bacilli: isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J. Exp. Med.* 1950; **91**: 197-217.
- BLUESTONE JA and ABBAS AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; **3**:253–257.
- BOTHAMLEY GH, BECK JS, SCHREUDER GM, D'AMARO J, de VRIES RR, KARDJITO T, IVANYI J. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis.* 1989; **159**:549–55.
- BOUSSIOTIS VA, TSAI EY, YUNIS EJ, THIM S, DELGADO JC, DASCHER CC, BEREZOVSKAYA A, ROUSSET D, REYNES JM, GOLDFELD AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Investig.* 2000; **105**:1317–1325.
- BRIGHTBILL HD, LIBRATY DH, KRUTZIK SR, YANG R, BELISLE JT, BLEHARSKI JR, MAITLAND M, NORGDARD MV, PLEVY SE, SMALE ST, BRENNAN PJ, BLOOM BR, GODOWSKI PJ, MODLIN RL. Host defense

mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors, *Science* 1999; **285**:732–736.

BROWN AE, HOLZER TJ and ANDERSEN BR. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 1987; **156**:985–989.

BRUDER D, PROBST-KEPPER M, WESTENDORF AM, GEFFERS R, BEISSENT S, LOSER K, VON BOEHMER H, BUER J, HANSEN W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; **34**:623-630.

CARUSO AM, SERBINA N, KLEIN E, TRIEBOLD K, BLOOM BR, FLYNN JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. *J Immunol.* 1999; **162**:5407-16.

CASANOVA JL and ABEL L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:581–620.

CASARINI M, AMEGLIO F, ALEMANNO L, ZANGRILLI P, MATTIA P, PAONE G, BISETTI A, GIOSUE S. Cytokine levels correlate with a radiologic score in active pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; **159**:143–148.

CASTELO FILHO A, KRITSKI AL, BARRETO AW, LEMOS ACM, RUFFINO NETTO A, GUIMARÃES CA, et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *J. bras. pneumol.* 2004;**30 Suppl 1**:57-86.

CHAN J, RAN X., HUNTER SW, BRENNAN PJ, BLOOM BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 1991; **59**:1755–1761.

CHAN J, XING Y, MAGLIOZZO RS and BLOOM BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 1992; **175**:1111-1122.

CHAN, J, FAN XD, HUNTER SW, BRENNAN PJ, BLOOM BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 1991; **59**:1755-1761.

CHANG CC, CIUBOTARIU R, MANAVALAN JS, YUAN J, COLOVAI AI, PIAZZA F, LEDERMAN S, COLONNA M, CORTESINI R, DALLA-FAVERA R, SUCIU-FOCA N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; **3**(3): 237-43.

CHEN X, ZHOU B, LI M, DENG Q, WU X, LE X, WU C, LARMONIER N, ZHANG W, ZHANG H, WANG H, KATSANIS E. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 2007; 123:50-59.

CHO S, MEHRA V, THOMA-USZYNSKI S, STENGER S, SERBINA N, MAZZACCARO RJ, FLYNN JL, BARNES PF, SOUTHWOOD S, CELIS E, BLOOM BR, MODLIN RL, SETTE A. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8_T cells in human tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; **97**:12210–12215.

COOPER AM, SOLACHE A, KHADER SA. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr Opin Immunol*. 2007; **19**:441-447.

COSMA CL, SHERMAN DR and RAMAKRISHNAN L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. 2003; **57**:641-676.

COUTO, Jamile. **Estudo dos mecanismos de vitrulência de cepas resistentes e sensíveis de Mycobacterium tuberculosis**. 2008. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

de JONG R, ALTARE F, HAAGEN IA, ELFERINK DG, BOER T, VAN BREDA VRIESMAN PJ, KABEL PJ, DRAAISMA JM, VAN DISSEL JT, KROON FP, CASANOVA JL, OTTENHOFF TH. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998; **280**:1435–8.

DEAGLIO S, DWYER KM, GAO W, FRIEDMAN D, USHEVA A, ERAT A, CHEN JF, ENJYOJI K, LINDEN J, OUKKA M, KUCHROO VK, STROM TB, ROBSON SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; **204**:1257-1265.

DING AH, NATHAN CF and STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; **141**:2407-2412.

Disponível em: www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html.

DOFFINGER R, PATEL S, KUMARARATNE DS. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* 2005; **17**:440–446.

- DOHERTY TM and ARDITI M. TB or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest.* 2004; **114**:1699-1703.
- EHLERS S. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; **23**:149-158.
- FAHLEN L, READ S, GORELIK L, HURST SD, COFFMAN RL, FLAVELL RA, POWRIE F. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; **201**:737-746.
- FLYNN JL and CHAN J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol.* 2005; **13**:98-102.
- FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, TRIEBOLD KJ, KOLLER B, BLOOM BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; **89**:12013-7.
- FONTENOT JD, DOOLEY JL, FARR AG, RUDENSKY AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.* 2005; **202**:901–906.
- FORTUNE SM, SOLACHE A, JAEGER A, HILL PJ, BELISLE JT, BLOMM BR, RUBIN EJ, ERNST JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and –independent mechanisms. *J Immunol.* 2004; **172**:6272-6280.
- FRATTI RA, CHUA J, VERGNE I, DERETIC V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**(9):5437-5442.
- FRIEDEN TR, FUJIWARA PI, WASHKO RM, HAMBURG MA. Tuberculosis in New York City—turning the tide. *N. Engl. J. Med.* 1995; **333**: 229–233.
- FRIEDEN TR, STERLING T, MENDES AP, et al. The emergence of drug-resistant-tuberculosis in New York City. *N Eng J Med* 1993; **318**: 521.
- FUJIWARA H, AOTANI T, TSUYUGUCHI I. From the immunological aspect-interleukin-10 production by human blood mononuclear cells stimulated with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Kekkaku.* 1996; **71**(1):43-6.
- GARG A, BARNES PF, ROY S, QUIROGA MF, WU S, GARCÍA VE, KRUTZIK SR, WEIS SE, VANKAYALAPATI R. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2- dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol.* 2008; **38**(2):459-69.
- GELUK A, VAN MEIJAARDEN KE, FRANKEN KL, DRIJFHOUT JW, SOUZA SD, NECKER A, HUYGEN K, OTTENHOFF TH. Identification of major epitopes of

- mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8₊ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *J. Immunol.* 2000; **165**:6463–6471.
- GEORGE KM, YUAN Y, SHERMAN DR, BARRY CE III. The biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification and functional analysis of CMAS-2. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 27292–27298.
- GERCKEN J, PRYJMA J, ERNST M, FLAD HD. Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect. Immun.* 1994; **62**:3472–3478.
- GEROSA F, NISII C, RIGHETTI S, MICCIOLO R, MARCHESINI M, CAZZADORI A, TRINCHIERI G. CD4₊ T cell clones producing both interferon- γ and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin. Immunol.* 1999; **92**:224–234.
- GONG J, ZHANG M, MODLIN RL, LINSLEY PS, IYER DV, LIN Y, BARNES PF. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect. Immun.* 1996; **64**:913-918.
- GROHMANN U, FALLARINO F, PUCETTI P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003; **24**:242-248.
- GROSSMAN WJ, VERBSKY JW, BARCHET W, COLONNA M, ATKINSON JP, LEY TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004; **21**:589-601.
- GROTZKE JE and LEWINSOHN DM. Role of CD8⁺ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 2005; **7**:776-788.
- GUTIERREZ MG, MASTER SS, SINGH SB, TAYLOR GA, COLOMBO MI, DERETIC V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004; **119**:753-766.
- GUYOT-REVOL V, INNES JA, HACKFORTH S, HINKS T, LALVANI A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **173**:803-810.
- HELDWEIN KA and FENTON MJ. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect* 2002; **4**:937-944.
- HENDERSON RA, WATKINS SC and FLYNN JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1997; **159**:635–643.

HIRSCH CS, ELLNER JJ, RUSSELL DG, RICH EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1994; **152**:743–753.

HIRSCH CS, TOOSI Z, JOHNSON JL, LUZZE H, NTAMBI L, PETERS P, MCHUGH M, OKWERA A, JOLOBA M, MUGYENYI P, MUGERWA RD, TEREBUH P, ELLNER JJ. Augmentation of apoptosis and interferon-gamma production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2001; **183**:779–788.

HIRSCH CS, TOOSI Z, OTHIENO C, JOHNSON JL, SCHWANDER SK, ROBERTSON S, WALLIS RS, EDMONDS K, OKWERA A, MUGERWA R, PETERS P, ELLNER JJ. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J. Infect. Dis.* 1999; **180**:2069–2073.

HIRSCH CS, TOOSI Z, VANHAM G, JOHNSON JL, PETERS P, OKWERA A, MUGERWA R, MUGYENYI P, ELLNER JJ. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 1999; **179**:945–953.

HOHEISEL G, IZBICKI G, ROTH M, CHAN CH, LEUNG JC, REICHENBERGER F, SCHAUER J, PERRUCHOUD AP. Compartmentalization of pro-inflammatory cytokines in tuberculous pleurisy. *Respir. Med.* 1998; **92**:14–17.

HUANG CT, WORKMAN CJ, FLIES D, PAN X, MARSON AI, ZHOU G, HIPKISS EI, RAVI S, KOWALSKI J, LEVITSKY HI, POWELL JD, PARDOLL DM, DRAKE CG, VIGNALI DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; **21**:503–513.

HUNTER SW, GAYLORD H and BRENNAN PJ. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**:12345–12351.

Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; **92**: 6630–6634.

JOHNSON CM, COOPER AM, FRANK AA, BONORINO CB, WYSOKI LJ, ORME IM. *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. *Tuber Lung Dis* 1997; **78**:257–261.

JONES B, MEANS T, HELDWEIN K, KEEN M, HILL P, BELISLE J, FENTON M. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses, *J. Leukoc. Biol* 2001; **69**:1036–1044.

JONES GS, AMIRAUULT HJ and ANDERSEN BR. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. *J. Infect. Dis.* 1990; **162**:700–704.

JORDAN MS, BOESTEANU A, REED AJ, PETRONE AL, HOLENBECK AE, LERMAN MA, NAJI A, CATON AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2001; **2**:301–306.

KANEDA K, SUMI Y, KURANO F, KATO Y, YANO I. Granuloma formation and hemopoiesis induced by C36-48. *Infect. Immun.* 1986; **54**: 869-875.

KAUFMANN SH. Gama/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they do? *Proc Natl Acad Sci.* 1999; **93**:2272.

KAUFMANN SH. Gama/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they do? *Proc Natl Acad Sci.* 1999; **93**:2272.

KAUFMANN SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol.* 2005; **26**(12):660-7.

KEANE J, BALCEWICZ-SABLINSKA MK, REMOLD HG, CHUPP GL, MEEK BB, FENTON MJ, KORNFELD H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* 1997; **65**:298–304.

KEANE J, BALCEWICZ-SABLINSKA MK, REMOLD HG, CHUPP GL, MEEK BB, FENTON MJ, KORNFELD H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* 1997; **65**:298–304.

KEANE J, GERSHON S, WISE RP, MIRABILE-LEVENS E, KASZNICA J, SCHWIETERMAN WD, SIEGEL JN, BRAUN MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med* 2001; **345**:1098–1104.

KHADER S, PEARL J, SAKAMOTO K, GILMARTIN L, BELL G, JELLEY-GIBBS D, GHILARDI N, DESAUVAGE F, COOPER A. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J. Immunol.* 2005;**175**:788–795.

- KINDLER V, SAPPINO AP, GRAU GE, PIGUET PF, VASSALLI P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989; **56**:731–740.
- KOCH R. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Berl. Klin. Wochenschr.* **19**:221–230. Reprint, *Am. Rev. Tuberc.* 1882; **25**:285–323, 1932.
- KOLLS J and LINDEN A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; **21**:467–476.
- KORBEL DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* 2008; **10**(9):995-1004
- KRETSCHMER K, APOSTOLOU I, HAWIGER D, KHAZAIE K, NUSSENZWEIG MC, VON BOEHMER H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; **6**:1219-1227.
- KUMARARATNE DS. Tuberculosis and immunodeficiency--of mice and men. *Clin Exp Immunol* 1997;**107**:11–14.
- LADEL CH, BLUM C, DREHER A, REIFENBERG K, KOPF M, KAUFMANN SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect. Immun.* 1997; **65**:4843–4849.
- LANZAVECCHIA A. and SALLUSTO F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000; **290**:92.
- LAW K, WEIDEN M, HARKIN T, TCHOU WONG K, CHI C, ROM WN. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; **153**:799–804.
- LEE JS, SONG CH, KIM CH, KONG SJ, SHON MH, KIM HJ, PARK JK, PAIK TH, JO EK. Profiles of IFN- γ and its regulatory cytokines (IL-12, IL-18, and IL-10) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2002; **128**:516-524.
- LI L and WU CY. CD4+CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M. tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood* 2008; **111**:5629-5636.
- LIENHARDT C, AZZURRI A, AMEDEI A, FIELDING K, SILLAH J, SOW OY, BAH B, BENAGIANO M, DIALLO A, MANETTI R, MANNEH K, GUSTAFSON P, BENNETT S, D'ELIOS MM, McADAM K, DEL PRETE G. Active tuberculosis

in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. *Eur J Immunol* 2002; **32**:1605-1613.

LIPSITCH M and SOUSA A. O. Historical intensity of natural selection for resistance to tuberculosis. *Genetics*. 2002; **161**:1599–1607.

LIU PT, STENGER S, LI H, WENZEL L, TAN BH, KRUTZIK SR, OCHOA MT, SCHAUBER J, WU K, MEINKEN C, KAMEN DL, WAGNER M, BALS R, STEINMEYER A, ZUGEL U, GALLO RL, EISENBERG D, HEWISON M, HOLLIS BH, ADAMS JS, BLOOM BR, MODLIN RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; **311**:1770-1773.

LOCKHART E, GREEN AM and FLYNN JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2006; **177**:4662-4669.

LÓPEZ B, AGUILAR D, OROZCO H, BURGER M, ESPITIA C, RITACCO V, BARRERA L, KREMER K, HERNANDEZ-PANDO R, HUYGEN K, VAN SOOLINGEN D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*. 2003; **133**:30–7.

LUCEY DR, CLERICI M, SHEARER GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; **9**:532–562.

MANCA C, TSENOVA L, BARRY CE III, BERGTOLD A, FREEMAN S, HASLETT PA, MUSSER JM, FREEDMAN VH, KAPLAN G. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response *in vivo* and *in vitro*, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol*. 1999; **162**:6740–6.

MANN MK, MARESZ K, SHRIVER LP, TAN Y, DITTEL BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; **178**:3447-3456.

MARCINKEVICIENE JA, MAGLIOZZO RS, AND BLANCHARD JS. Purification and characterization of the *Mycobacterium smegmatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. *J. Biol. Chem.* 1995; **38**:22290–22295.

MARIN ND, PARIS SC, VÉLEZ VM, ROJAS CA, ROJAS M, GARCÍA LF. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. *Tuberculosis*. 2010; **90**(4):252-61.

MAZZACCARO RJ, GEDDE M, JENSEN ER, VAN SANTEN HM, PLOEGH HL, ROCK KL, BLOOM BR. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; **93**:11786–11791.

MCDYER JF, HACKLEY MN, WALSH TE, COOK JL, SEDER RA. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4⁺ T cell counts have impaired Th1 responses. *J Immunol*. 1997; **158**(1):492-500.

MEANS TK, LIEN E, YOSHIMURA A, WANG S, GOLENBOCK DT, FENTON MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol*. 1999; **163**: 6748–6755.

MEANS TK, WANG S, LIEN E, YOSHIMURA A, GOLENBOCK DT, FENTON MJ. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *M. tuberculosis*, *J. Immunol* 1999; **163**:3920–3927.

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P and JANEWAY Jr CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; **388**:394–397.

MENDELSON M, WALTERS S, SMITH L, KAPLAN G. Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. *Tuberculosis*. 2005; **85**:407-413.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço. 5^a ed, Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia do Programa de Vigilância Epidemiológica da tuberculose multirresistente (Versão Preliminar). Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2005.

MIYAMOTO M, PRAUSE O, SJOSTRAND M, LAAN M, LOTVALL J, LINDEN A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J. Immunol*. 2003;**170**:4665–4672.

MOLLOY A, LAOCHUMROONVORAPONG P and KAPLAN G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J. Exp. Med*. 1994; **180**:1499–1509.

- MORLOCK GP, CRAWFORD JT, BUTLER WR, BRIM SE, SIKES D, MAZUREK GH, et al. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:2291-5.
- NEILL MA and KLEBANOFF SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. Exp. Med.* 1988; **167**:30-42.
- NEWPORT MJ, HUXLEY CM, HUSTON S et al. A mutation in the interferon-gamma receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Eng J Med* 1996; **335**:1941-9.
- NIGOU J, ZELLE-RIESER C, GILLERON M, THURNHER M, PUZO G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol.* 2001; **166**:7477-7485.
- NORTH RJ and JUNG YJ. Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004; **22**:599-623.
- NOSS EH, PAI RK, SELLATI TJ, RADOLF JD, BELISLE J, GOLENBOCK DT, BOOM WH, HARDING CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 2001; **167**: 910-918.
- NOSS EH, PAI RK, SELLATI TJ, RADOLF JD, BELISLE J, GOLENBOCK DT, BOOM WH, HARDING CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2001; **167**:910-918.
- NOZAKI Y, HASEGAWA Y, ICHIYAMA S, NAKASHIMA I, SHIMOKATA K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1997; **65**:3644-3647.
- O'NEILL LA and GREENE C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J. Leukoc. Biol.* 1998; **63**:650-657.
- OPPMANN B, LESLEY R, BLOM B, TIMANS JC, XU Y, HUNTE B, VEJA F, YU N, WANG J, SINGH K, ZONIN F, VAISBERG E, CHURAKOVA T, LIU M, GORMAN D, WAGNER J, ZURAWSKI S, LIU Y, ABRAMS JS, MOORE KW, RENNICK D, WAAL-MALEFYT R, HANNUM C, BAZAN JF, KASTELEIN RA.

Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000; **13**:715-725.

PABLOS-MENDES A, RAVIGLIONE MC, LASZLO A, BINKIN N, RIEDER HL, BUSTREO F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med*. 1998; **338**(23):1641-9.

PABST MJ, GROSS JM, BROZNA JP, GOREN MB. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol*. 1988; **140**:634-640.

PALACI, Moisés. **Estudo sobre a patogenicidade *in vitro* de subtipos genéticos do *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes às drogas anti-tuberculose.** 2001. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PANCHOLI P, MIRZA A, BHARDWAJ N, STEINMAN RM. Sequestration from immune CD4₊ T cells of mycobacteria growing in human macrophages. *Science* 1993; **260**:984-986.

PANDIYAN P, ZHENG L, ISHIHARA S, REED J, LENARDO MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2007; **8**:1353-1362.

PLACIDO R, MANCINO G, AMENDOLA A, MARIANI F, VENDETTI S, PIACENTINI M, SANDUZZI A, BOCCHINO ML, ZEMBALA M, COLIZZI V. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Pathol*. 1997; **181**:31-38.

PORCELLI SA and MODLIN RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol*. 1999; **17**:297-329.

POWRIE F and COFFMAN RL. Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Res. Immunol*. 1993; **144**:639-643.

QUESNIAUX V, et al. Toll-like receptor pathways in the immune response to mycobacteria. *Microbes Infect*. 2004; **6**:946-959.

RAJASHREE P, SUPRIYA P, SULOCHANA DD. Differential migration of human monocyte-derived dendritic cells after infection with prevalent clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*. 2008; **213**:567-575.

RAJAVELU P and DAS SD. Expression of co-stimulatory molecules B7.1 & B7.2 on macrophages infected with various strains of *Mycobacterium tuberculosis* & its influence on T cell apoptosis. *Indian J Med Res.* 2008; **127**:388-394.

RESENDE CÓ T, HIRSCH CS, TOOSI Z, DIETZE R, RIBEIRO-RODRIGUES R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin Exp Immunol.* 2007; **147**(1):45-52.

RIBEIRO-RODRIGUES R, RESENDE CÓ T, ROJAS R, TOOSI Z, DIETZE R, BOOM WH, MACIEL E, HIRSCH CS. A role for CD4⁺ CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2006; **144**:25-34.

RIOS-BARRERA VA, CAMPOS-PENA V, AGUILAR-LEON D, LASCURAIN LR, MERAZ-RIOS MA, MORENO J, FIGUEROA-GRANADOS V, HERNANDEZ-PANDO R. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. *Eur J Immunol.* 2006; **36**:345-353.

ROCHA-RAMIREZ LM, ESTRADA-GARCÍA I, LÓPEZ-MARÍN LM, SEGURA-SALINAS E, MÉNDEZ-ARAGÓN P, VAN SOOLINGEN D, TORRES-GONZÁLEZ R, CHACÓN-SALINAS R, ESTRADA-PARRA S, MALDONADO-BERNAL C, LÓPEZ-MACÍAS C, ISIBASI A. *Mycobacterium tuberculosis* lipids regulate cytokines, TLR- 2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis.* 2007; **88**:212-220.

ROJAS M, GARCIA LF, NIGOU J, PUZO G, OLIVIER M. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca₂-dependent cell signaling. *J. Infect. Dis.* 2000; **182**:240–251.

ROM WN, GARAY S. *Tuberculosis.* New York: Little, Brown; 1996.

ROSEMBERG J. *Tuberculose panorama global. Óbices para o seu controle.* Brasil, 1999.

SALGAME P. Host innate and th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol.* 2005; **17**(4):374-80.

SANCHEZ FO, RODRIGUEZ JI, GARCIA LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect. Immun.* 1994; **62**:5673–5678.

- SAUNDERS BM and BRITTON WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.* 2007; **85**:103-111.
- SAUNDERS BM and COOPER AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 2000; **78**:334-341.
- SAUNDERS BM, FRANK AA, ORME IM, COOPER AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 2000; **68**:3322–3326.
- SCHAUF V, ROM WN, SMITH KA, SAMPAIO EP, MEYN PA, TRAMONTANA JM, COHN ZA, KAPLAN G. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. *J. Infect. Dis.* 1993; **168**:1056–1059.
- SCHINDLER R, MANCILLA J, ENDRES S, GHORBANI R, CLARK SC, DINARELLO CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 1990; **75**:40–47.
- SCHLESINGER LS, KAUFMAN TM, IYER S, HULL SR, MARCHIANDO LK. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J. Immunol.* 1996; **157**:4568–4575.
- SCHLESINGER LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* 1993; **150**:2920–2930.
- SCHLESINGER LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* 1993; **150**:2920–2930.
- SCHUMACHER A, WAFULA PO, BERTOJA AZ, SOLLWEDEL A, THUERE C, WOLLENBERG I, YAGITA H, VOLK HD, ZENCLUSSEN AC. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007; **110**:1137-1145.
- SEAH GT and ROOK GA. High levels of mRNA encoding IL-4 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients revealed by quantitative nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction; correlations with serum IgE levels. *Scand J Infect Dis* 2001; **33**:106-9.

SEAH GT, SCOTT GM, ROOK GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000; **181**(1):385-9.

SEDDON B and MASON D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of Transforming Growth Factor Beta and Interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4⁺CD45RC⁻ cells and CD4⁺CD8⁻ thymocytes. *J. Exp. Med.* 1999; **189**:279–288.

SENALDI G, YIN S, SHAKLEE CL, PIGUET PF, MAK TW, ULICH TR. *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J. Immunol.* 1996; **157**:5022–5026.

SERGEJEVA S, IVANOV S, LOTVALL J, LINDEN A. IL-17 as a recruitment and survival factor for airway in allergic airway inflammation. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 2005; **33**:248–253.

SHAW TC, THOMAS LH and FRIEDLAND JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine.* 2000; **12**:483–486.

SHEVACH EM, DiPAOLO RA, ANDERSON J, ZHAO DM, STEPHENS GL, THORNTON AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; **212**:60-73.

SILVA JRL, et al. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2004; **30**(4).

SILVA MS, SENNA SG, RIBEIRO MO, VALIM AR, TELLES MA, KRITSKI AL, et al. Mutations in *KatG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(9):4471-74.

SINGH SB, DAVIS AS, TAYLOR GA, DERETIC V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science.* 2006; **313**:1438-1441.

SKJOT R. LV, OETTINGER T, ROSWINKRANDES I, RAVN P, BROCK I, JACOBSEN S, ANDERSEN P. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect. Immun.* 2000; **68**: 214–220.

SLY LM, HINGLEY-WILSON SM, REINER NE, McMASTER WR. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis

dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 2003; **170**:430-437.

SMITH I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin. Microb. Rev.* 2003; **16**: 463-496.

SOUSA AO, MAZZACCARO RJ, RUSSELL RG, LEE FK, TURNER OC, HONG S, van KAER L, BLOOM BR. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; **97**:4204-8.

STENGER S, HANSON DA, TEITELBAUM R, DEWAN P, NIAZI KR, FROELICH CJ, GANZ T, THOMA-USZYNSKI S, MELIAN A, BOGDAN C, PORCELLI SA, BLOOM BR, KRENSKY AM, MODLIN RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998; **282**:121-5.

STENGER S, NIAZI KR and MODLIN RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998; **161**:3582-8.

STENGER, S., D. A. HANSON, R. TEITELBAUM, P. DEWAN, K. R. NIAZI, C. J. FROELICH, T. GANZ, S. THOMA-USZYNSKI, A. MELIAN, C. BOGDAN, S. A. PORCELLI, B. R. BLOOM, A. M. KRENSKY, AND R. L. MODLIN. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998; **282**:121–125.

STOCKINGER B and VELDHOFEN M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Op. Immunol.* 2007; **19**:281–286.

SURCEL HM, BLOMBERG MT, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 1994; **81**:171–176.

TAHA RA, KOTSIMBOS TC, SONG YL, MENZIES D, HAMID Q. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; **155**:1135–1139.

TEIXEIRA HC, ABRAMO C and MUNK ME. *J Bras Pneumol.* 2007; **33**(3):323-334.

TELENTI A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. *Clin Chest Med.* 1997; **18**(1):55-64.

THURNHER M, RAMONER R, GASTL G, RADMAYR C, BOCK G, HEROLD M, KLOCKER H, BARTSCH G. Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int. J. Cancer*. 1997; **70**:128–134.

TING LM, KIM AC, CATTAMANCHI A, ERNST JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol*. 1999; **163**(7):3898-906.

TOOSSI Z and ELLNER JJ. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 1998; **87**:107–114.

TOOSSI Z, GOGATE P, SHIRATSUCHI H, YOUNG T, ELLNER JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J. Immunol*. 1995; **154**:465–473.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**, 6^a ed. Artmed Editora, p. 311, 2000.

TURNER J, FRANK AA, BROOKS JV, GONZALEZ-JUARRERO M, ORME IM. The progression of chronic tuberculosis in the mouse does not require the participation of B lymphocytes or interleukin-4. *Exp Gerontol* 2001;**36**:537–545.

UMEMURA M, YAHAGI A, HAMADA S, BEGUM MD, WATANABE H, KAWAKAMI K, SUDA T, SUDO K, NAKAE S, IWAKURA Y, MATSUZAKI G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 2007; **178**:3786-3796.

UNDERHILL DM, OZINSKY A, SMITH KD, ADEREM A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; **96**:14459–14463.

VALONE S E, RICH EA, WALLIS RS, ELLNER JJ. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole Mycobacterium bovis BCG and mycobacterial antigens. *Infect. Immun*. 1988; **56**:3313–3315.

van CREVEL R, KARYADI E, PREYERS F, LEENDERS M, KULLBERG BJ, NELWAN RHH, van DER MEER JWM. Increased production of interleukin 4 by CD4₊ and CD8₊ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J. Infect. Dis*. 2000; **181**:1194–1197.

- VANHEYNINGEN TK, COLLINS HL, RUSSELL DG. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J. Immunol.* 1997; **158**:330–337.
- VERVER S, WARREN RM, BEYERS N, RICHARDSON M, SPUY GD, BORGDORFF MW, ENARSON DA, BEHR MA, HELDEN PD. Rate of Reinfection Tuberculosis after Successful Treatment Is Higher than Rate of New Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; **171**:1430-35.
- VISINTIN A, MAZZONI A, SPITZER JH, WYLLIE DH, DOWER SK, SEGAL DM. Regulation of toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 2001; **166**:249–255.
- VUKMANOVIC-STEJIC M, ZHANG Y, COOK JE, FLETCHER JM, McQUAID A, MASTERS JE, RUSTIN MHA, TAAMS LS, BEVERLEY PCL, MACALLAN DC, AKBAR AN. Human CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest.* 2006; **116**:2423-433.
- WARDS BJ, DE LISLE GW, AND COLLINS DM. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tubercle Lung Dis.* 2000; **80**:185–189.
- WING K, FEHERVARI Z, SAKAGUCHI S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006; **18**:991-1000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control. *A short update to the 2009 report.* WHO, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treatment of tuberculosis guidelines. WHO, 2009; p. 29.
- YAMAGUCHI T, HIROTA K, NAGAHAMA K, OHKAWA K, TAKAHASHI T, NOMURA T, SAKAGUSHI S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 2007; **27**:145-159.
- YOUNG DB, PERKINS MD, DUNCAN K, BARRY CE, 3rd. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J Clin Invest.* 2008; **118**:1255-1265.
- YUAN Y, LEE RE., BESRA GS, BELISLE JT, BARRY CE III.
- ZHANG M, GONG J, PRESKY DH, XUE W, BARNES PF. Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J. Immunol.* 1999; **162**:2441–2447.

ZIMMERLI S, EDWARDS S and ERNST JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; **15**:760–770.