



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Raquel da Silva Corrêa**

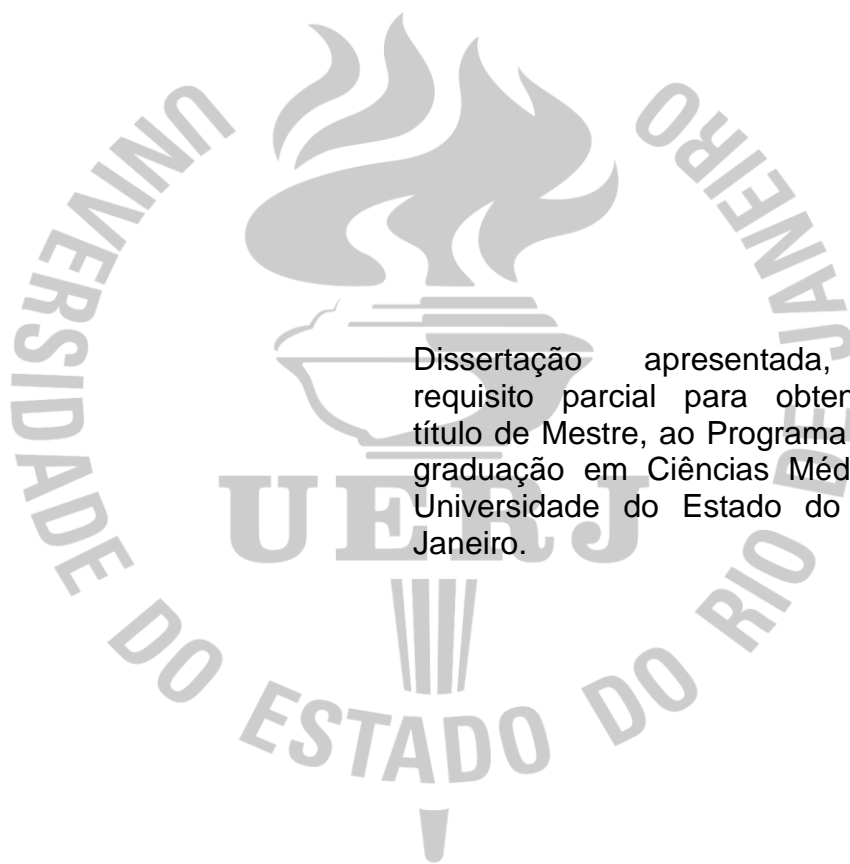
**Avaliação de marcadores biológicos com potencial para  
detecção da evolução para doença em tuberculose**

**Rio de Janeiro**

**2012**

Raquel da Silva Corrêa

**Avaliação de marcadores biológicos com potencial para detecção da  
evolução para doença em tuberculose**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marilza de Moura Ribeiro Carvalho

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C824 Corrêa, Raquel da Silva.  
Avaliação de marcadores biológicos com potencial para  
detecção da evolução para doença em tuberculose / Raquel da  
Silva Corrêa. – 2012.  
83 f. : il.

Orientador: Geraldo Moura Batista Pereira.  
Coorientadora: Marilza de Moura Ribeiro Carvalho.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em  
Ciências Médicas.

1. Mycobacterium tuberculosis – Teses. 2. Tuberculose –  
Teses. 3. Inflamação – Teses. I. Pereira, Geraldo Moura Batista.  
II. Carvalho, Marilza de Moura Ribeiro. III. Universidade do Estado  
do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-002.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial  
desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Raquel da Silva Corrêa

**Avaliação de marcadores biológicos com potencial para detecção da  
evolução para doença em tuberculose**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de agosto de 2012.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dra. Marilza de Moura Ribeiro Carvalho (Coorientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

---

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2012

## DEDICATÓRIA

Aos alicerces da minha vida,

Meus pais, Sergio e Marinete pelo amor, carinho e dedicação de sempre.

Ao meu irmão Roberto, conselheiro e amigo de sempre.

Ao meu namorado Marcelo, companheiro que tanto me incentivou e apoiou em todos os momentos.

Em memória de minha amada avó materna e grande amiga Anésia, e meu amado avô paterno e companheiro Alcides. Saudades eternas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Geraldo Moura Batista Pereira, pela contribuição durante a minha formação acadêmica.

A minha coorientadora Marilza de Moura Ribeiro Carvalho e a Ana Paula Gomes por terem me escolhido para tal oportunidade.

A todos do Serviço de Pneumologia e Tisiologia do HUPE (Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ): Aos professores da Disciplina de Pneumologia e Tisiologia da FCM e do Serviço de Pneumologia e Tisiologia do HUPE, Prof. Helio Ribeiro de Siqueira, Prof. Domenico Capone, Prof. Rogério Lopes Rufino Alves pelo apoio e participação neste projeto.

À amiga Janaina Aparecida de Medeiros Leung, enfermeira responsável pela coleta de sangue dos voluntários no projeto.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Celular do Pavilhão de Hanseníase / Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) e da Disciplina de Patologia Geral da FCM (UERJ): À Dra. Verônica Schmitz Pereira; Dra. Luciana Silva Rodrigues, Dra. Iris Maria Peixoto Alvim, à Marcela da Silva Sousa, Fernanda Marques de Carvalho, Marjorie M. S. Guimarães, e à Robertha Lemes pelo compartilhamento de seus aprendizados e amizade.

Ao Dr. Milton Ozório de Moraes do Laboratório de Hanseníase (IOC - Fiocruz).

A Dra. Anna Beatriz Robottom Ferreira da EMBRAPA.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves do INCA.

Aos amigos Otto Castro Nogueira, Laís Freitas Teles do Nascimento, Juliane Barros da Silva, Vilma de Figueiredo e Viviane G. C. de Oliveira.

À equipe da secretaria, da sala de esterilização, da portaria e de serviços gerais pela excelente qualidade no trabalho, facilitando assim o desenvolvimento dos meus experimentos. E claro, também, à amizade e carinho durante esta jornada.

Às professoras pelo apoio e exemplos estimulantes: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, pesquisadora titular chefe do Laboratório de Microbiologia

Celular, IOC – Fiocruz e Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi, professora associada de Microbiologia e Imunologia, FCM - UERJ.

A todos os pacientes e voluntários que aceitaram participar deste estudo.

E a minha família, meu namorado e aos meus amigos que apenas por existirem tornam minha vida mais feliz.

Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você continuará  
vivendo, mas terá deixado de existir.

*Charles Chaplin*



## RESUMO

CORRÊA, Raquel da Silva. *Avaliação de marcadores biológicos com potencial para detecção da evolução para doença em tuberculose*. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa obtida a partir da inalação de aerossóis contendo seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*. A TB acomete principalmente os pulmões e é a patologia bacteriana líder em causar mortes no mundo. No Brasil, por ano, são notificados 69 mil casos de tuberculose, dos quais 4,6 mil evoluem para o óbito. Durante a infecção pelo *M. tuberculosis*, 90% dos indivíduos permanece na forma 'latente' assintomática, e aproximadamente 10% evolui para doença. Este trabalho estudou parâmetros de resposta imune e inflamatória, em indivíduos de ambos os sexos, com idades de 18 a 65 anos, com diferentes graus de exposição ao *M. tuberculosis* (indivíduos não-expostos ao *M. tuberculosis*, TST < 5 mm, n= 30; indivíduos com tuberculose latente, TST ≥ 5 mm, n=29; pacientes com tuberculose pulmonar n= 22). Nossos resultados mostraram que o TST isoladamente falhou em detectar todos os indivíduos expostos ao *M. tuberculosis*, e em 1/3 dos TST positivos não foi observada resposta *in vitro* a antígenos específicos de *M. tuberculosis*, avaliada com os biomarcadores IFN- $\gamma$  e CXCL10. Houve uma alta correlação entre os biomarcadores IFN- $\gamma$  e CXCL10 em culturas de sangue não fracionado estimuladas com antígenos específicos de *M. tuberculosis*. A utilização combinada destes 2 biomarcadores mostrou positividade para *M. tuberculosis* em 94,4% dos pacientes. Foram observadas diferenças marcantes de nível de expressão de RNA mensageiro específicos para CD64, GTPase associada a Ras, lactoferrina, PDL-1 e CXCL10, mas não para OASL em leucócitos sanguíneos, quando os pacientes com tuberculose pulmonar foram comparados com os dois outros grupos de voluntários. Da mesma forma, os níveis de expressão dos receptores CD64 e CD163 foram significativamente mais elevados em neutrófilos dos pacientes quando comparados com os grupos-controle. Tomadas em conjunto, nossas observações sugerem que o uso de mais de um biomarcador aumenta a sensibilidade e especificidade dos métodos para detecção de infecção latente por *M. tuberculosis* e tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Inflamação. Tuberculose ativa. Tuberculose latente. IFN-  $\gamma$ . CXCL10. Biomarcadores.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease acquired by inhalation of aerosols containing its etiologic agent, *Mycobacterium tuberculosis*. TB primarily affects the lungs and is the leading bacterial cause disease deaths worldwide. Yearly, in Brazil, 69.000 cases of TB are reported, with 4.600 of these cases evolving to death. In the course of this infection 90% of the cases remain as 'latent' asymptomatic, and approximately 10% of the infected individuals progress to disease. This study investigated parameters of immune and inflammatory response in 18 to 65 years old subjects of both genders, with different degrees of exposure to *M. tuberculosis* (non-exposed controls, TST < 5 mm, n= 30; individuals with latent TB, TST ≥ 5 mm; patients with pulmonary tuberculosis, n= 22). Our results demonstrated a failure of the TST to detect all the *M. tuberculosis*-exposed individuals, and in 1/3 of the TST positive ones there was no specific IFN- $\gamma$  or CXCL10 *in vitro* response to *M. tuberculosis*-specific antigens. A direct correlation between the IFN- $\gamma$  e CXCL10 responses was observed in whole-blood cultures stimulated with these specific antigens. The combined use of these two markers allowed us to detect a positive test for *M. tuberculosis*-specific antigens in 94,4% of the patients. There were marked differences in blood leukocyte specific mRNA levels for CD64, Ras-associated GTPase, lactoferrin, PDL-1 and CXCL10, but not for OASL, when tuberculosis patients were compared to the two other volunteer groups. In the same way, the levels of expression for CD64 and CD163 were significantly more elevated in the neutrophils of patients in comparison with the other two groups of healthy volunteers. Taken together our observations suggest that using more than one biomarker increases the sensitivity and specificity of the methods for the detection of *M. tuberculosis* latent infection and tuberculosis.

Key-words: *Mycobacterium tuberculosis*. Inflammation. Active tuberculosis. Latent tuberculosis. IFN- $\gamma$ . CXCL10. Biomarkers.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade mediada por anticorpos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
bp	Pares de base
CCL	Ligante de quimiocinas CC
CCR	Receptor de quimiocinas CC
CD	<i>do inglês, Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CFP-10	<i>do inglês, Culture filtrate protein-10 kDa</i>
CLRs	Receptores de lectina do tipo C
CMI	Resposta imune mediada por células
CMS	Células mononucleares de sangue periférico
CNCT	Campanha Nacional Contra a Tuberculose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cp	Ciclo de amplificação
Cq	Crossing point (ponto característico)
CXCL	Ligante de quimiocina CXC
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O	Densidade óptica
DTH	Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (tipo IV)
ELISA	<i>do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
ESAT-6	<i>do inglês, Early secretory antigenic target 6 kDa</i>
FAS	Ácido graxo sintetase
Fc $\gamma$ R I	Receptor I de Fc $\gamma$
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FL 1	Fluorescência verde

FL 2	Fluorescência amarela
Fluos	Fluos
FSC	Forward Scatter (tamanho celular)
GTPase - RAS	<i>do inglês, Ras-associated small GTPases (Rabs)</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos - região DR
HPRT 1	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase 1
HRP	Peroxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IFN- γ	Interferon gama
IGRA	<i>do inglês, Interferon Gamma Release Assay</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IP-10	<i>do inglês, Induced protein 10</i>
LCF	Lactoferrina
μ	Micro
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MDR	Droga multiresistente
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MNTB	Micobactéria não tuberculosa
MO	Monócitos
MOI	Multiplicidade de infecção
MS	Ministério da Saúde
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NE	Controles não expostos ao <i>M. tuberculosis</i>
NK	Células natural killer
NKT	Linfócitos T natural killer
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NRAMP-1	Proteína 1 de macrófagos associadas a resistência

OAS	2'-5' oligoadenilato sintetase
OASL	Ligante de 2'-5' oligoadenilato sintetase
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade de acaso
PBST	Tampão salino com fosfato e tween
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PD-1	Receptor 1 de morte programa
PD-L1	Ligante 1 de morte celular programada
PE	Ficoeritrina (fluoróforo)
PE	Pro-Glu (família de proteínas ácido-glicina)
PE-Cy	Ficoeritrina-cianina
pg/mL	Picograma por mililitro
PGRS	Sequência CG polimórfica repetitiva
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PNCT	Programa Nacional Contra a Tuberculose
PPD	Derivado proteico purificado
PPE	Pro-Pro-Glu
QFT TB G IT	<i>do ingles, Quantiferon TB Gold in tube</i>
PCR	Reação de Polimerase em cadeia
qRT-PCR Real Time	PCR quantitativo em tempo real
r	Coefficiente de correlação
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RNI	Intermediário reativo de nitrogênio
ROI	Intermediário reativo de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RPL 13	Proteína ribossomal L 13
RPS	Proteína ribossomal S
RT23	Cepa comercial de <i>M. tuberculosis</i>
SSC	Side Scatter (complexidade celular)
TB	Tuberculose
TBL	Tuberculose latente

TB7.7	Antígeno 7.7 de <i>M. tuberculosis</i>
TC	Tomografia computadorizada
TCAR	Tomografia computadorizada de alta resolução
TCR $\gamma\delta$	Receptores de células T de cadeia gama-delta
Th1	Linfócito T “helper”
TLRs	Receptores do tipo toll
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TST	<i>do inglês, Tuberculin skin test</i>
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
US	Unidade de Saúde
UT	Unidades de Tuberculina

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>TUBERCULOSE</b> .....	17
1.1	<b>Agente etiológico</b> .....	17
1.2	<b>Aspectos epidemiológicos</b> .....	19
1.3	<b>Aspectos clínicos</b> .....	21
1.4	<b>Aspectos imunológicos: patogênese da tuberculose</b> .....	23
1.5	<b>Diagnóstico da tuberculose: TB ativa</b> .....	27
1.5.1	<u>Diagnóstico bacteriológico</u> .....	27
1.5.2	<u>Diagnóstico radiológico</u> .....	28
1.6	<b>Diagnóstico da tuberculose: TB latente</b> .....	29
1.7	<b>Tratamento</b> .....	32
1.8	<b>Alterações em expressão gênica na patogênese da tuberculose</b> ..	33
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	37
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	37
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1	<b>População estudada e critérios de inclusão</b> .....	38
3.2	<b>Teste cutâneo tuberculínico</b> .....	39
3.3	<b>Ensaio para dosagem de IFN-<math>\gamma</math></b> .....	40
3.4	<b>Ensaio para dosagem de CXCL10 (IP-10)</b> .....	42
3.5	<b>Expressão de CD64 em leucócitos</b> .....	43
3.6	<b>Extração de RNA total</b> .....	44
3.7	<b>Síntese de DNA complementar (cDNA)</b> .....	45
3.8	<b>Reação de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)</b> .....	45
3.9	<b>Análise dos dados de qRT-PCR</b> .....	46
4	<b>RESULTADOS</b> .....	48
4.1	<b>TST não corresponde à resposta <i>in vitro</i> a antígenos específicos de <i>M. tuberculosis</i>, detectada utilizando IFN-<math>\gamma</math> como biomarcador</b>	48
4.2	<b>O uso de CXCL10 combinado a IFN-<math>\gamma</math> como alternativa para detecção de tuberculose latente e tuberculose pulmonar ativa</b> ....	51

4.3	Níveis de expressão de CD64 em leucócitos sanguíneos em indivíduos expostos ao <i>M. tuberculosis</i> e em pacientes com tuberculose pulmonar.....	55
4.4	Expressão gênica de moléculas-alvo em leucócitos sanguíneos	59
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
5.1	Diagnóstico de infecção latente por <i>M. tuberculosis</i> e de tuberculose pulmonar com TST, IFN- $\gamma$ e CXCL10.....	64
5.2	Expressão dos receptores imunomoduladores CD64 e CD163 em TBL e tuberculose pulmonar.....	66
5.3	Alterações de expressão gênica em leucócitos sanguíneos na tuberculose pulmonar.....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO</b> - Termo de consentimento livre e esclarecido para participação em projeto.....	81



## INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) continua a ser uma das mais perniciosas doenças infecciosas suportadas pela humanidade. A proteção conferida pela vacina BCG (bacilo Calmette Guérin, cepa atenuada de *M. bovis*) contra a meningoencefalite tuberculosa é bastante elevada, entretanto a eficácia contra a forma pulmonar é variada (1). Apesar do desenvolvimento de quimioterapia potencialmente curativa, a TB continua a causar aumento da morbidade, e é uma das principais causas de mortalidade humana no mundo em desenvolvimento (2).

O teste cutâneo de tuberculina também conhecido como teste do PPD permanece sendo o teste mais usado para detectar a tuberculose latente, entretanto, representa um desafio para os médicos, devido a sua baixa especificidade e pela reatividade cruzada com micobactérias não tuberculosas e com a vacina BCG. Dessa forma, os ensaios de IGRAs (do inglês *Interferon-gamma release assays*) são uma nova alternativa para o diagnóstico da tuberculose latente, pois, ao contrário do PPD, os IGRAs são menos influenciados por micobactérias ambientais, uma vez que, os antígenos usados no ensaio estão ausentes na maioria das micobactérias não tuberculosas (3).

Vale ressaltar, que os exames clínicos solicitados por médicos, em instituições de saúde, são de extrema importância para diagnosticar a infecção pelo *M. tuberculosis*, tornando possível rapidamente iniciar o tratamento da tuberculose. Apesar destes exames confirmarem a instalação da doença, é fundamental a utilização de testes que detectem marcadores biológicos presentes e expressos no organismo durante o processo inflamatório, que tem início na tuberculose latente. Dessa forma, o diagnóstico é obtido mais precocemente, permitindo o começo de um tratamento profilático, evitando assim, injúrias e constrangimento social acarretados pela doença.

# 1 TUBERCULOSE

## 1.1 Agente etiológico

A natureza contagiosa da TB foi inicialmente conhecida e descrita por Hipócrates e Galeno. Em meados de século XVII, Franciscus Sylvius e René Théophile Hyacinthe Laennec descreveram o tubérculo, e postularam que esta era uma estrutura comum a todas as formas da doença (4). Antes da identificação do agente etiológico, o termo "tuberculose" foi usado pela primeira vez por Shönlein em 1830 (5). Cinquenta e dois anos depois, em março de 1882, o médico alemão Heinrich Hermann Robert Koch comunicou a descoberta do agente etiológico, o *M. tuberculosis*, sendo ainda hoje denominado bacilo de Koch (4).

O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo, de ciclo celular com duração de 16 a 20 horas. Este é um tempo relativamente longo comparado a outras bactérias que normalmente tem suas divisões contadas em minutos (por exemplo, a *Escherichia coli* pode-se dividir a cada 20 minutos aproximadamente). Bactérias do gênero *Mycobacterium* são bastonetes delgados, aeróbicos, que crescem em cadeias retas ou ramificadas. As micobactérias possuem uma parede celular cerácea única, composta por ácido micólico, o qual as torna álcool-ácido resistentes, o que significa que elas irão reter colorações mesmo sob tratamento com uma mistura de ácido e álcool, entretanto, as micobactérias são fracamente gram-positivas (Figura 1; 7).

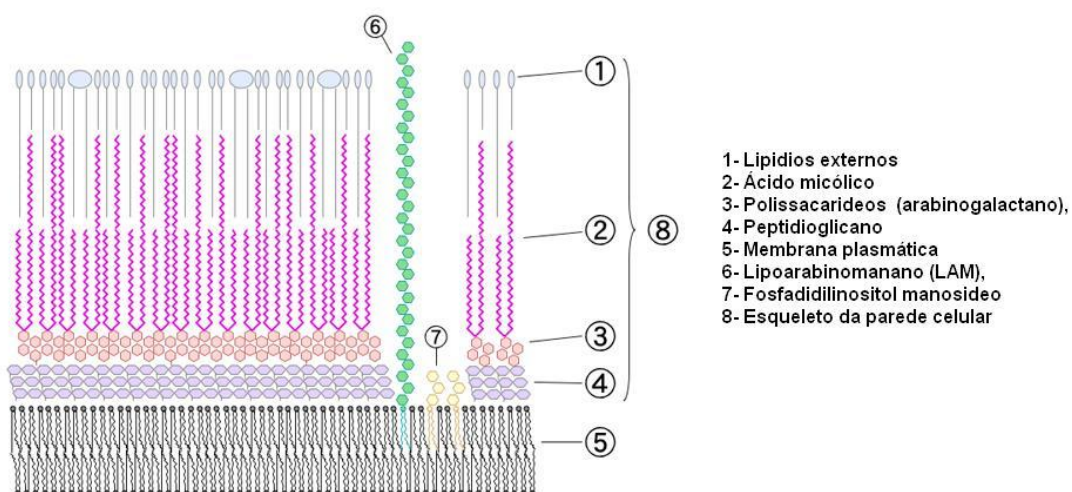


Figura 1: Diagrama representativo da parede celular da espécie *Mycobacterium* sp. (7)

O genoma completo do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, uma cepa de referência amplamente usada, foi completamente sequenciado em 1998. Estas análises mostraram que o genoma desta cepa contém 4.411.529 pares de base (bp) e em torno de 4.000 genes (Figura 2). Muitos desses genes estão envolvidos no metabolismo de lipídeos (cerca de 250 enzimas envolvidas). Micobactérias são as únicas bactérias que possuem a enzima de síntese de ácido graxo I (FAS I), a qual também é encontrada em muitas células eucarióticas, bem como a enzima de síntese de ácido graxo II (FAS II), que é encontrada na maioria dos procariontes e plantas. Esta capacidade metabólica permite que as micobactérias sintetizem suas complexas paredes ricas em lipídeos. Outra característica particular do genoma micobacteriano é o grande número de genes, cerca de 4% do total, contendo a sequência CG polimórfica repetitiva (PGRS) e que codifica para as famílias distintas, PE (Pro-Glu) e PPE (Pro-Pro-Glu) de proteínas ácido-glicina. A função destas proteínas é desconhecida, mas como muitas delas são encontradas na membrana da célula e na parede celular, elas podem mediar a variação antigênica e, assim afetar a virulência e a patogenicidade. Pelo menos uma proteína PE de *M. tuberculosis* liga-se à fibronectina e pode, portanto, ser de importância para a

patogenicidade facilitando a adesão aos tecidos e a entrada nas células hospedeiras (8).

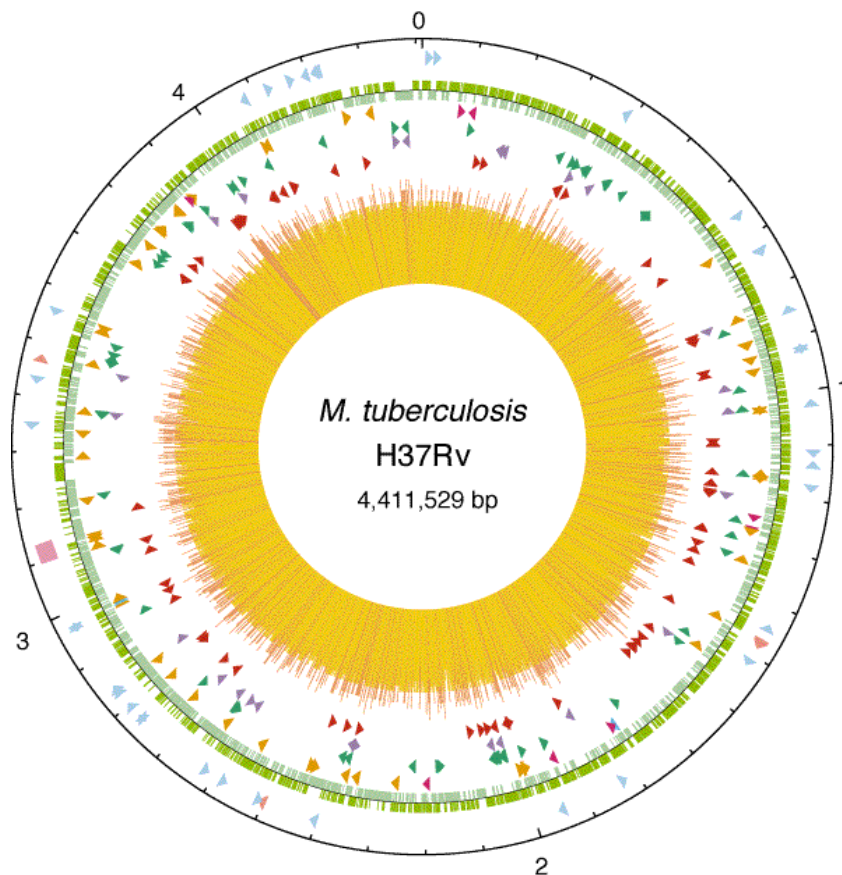


Figura 2: Representação diagramática do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (9).

## 1.2 Aspectos epidemiológicos

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2010, foram notificados 6,2 milhões de casos, dos quais, 82% se concentram em apenas 22 países. A tuberculose é responsável por 1,1 milhões de mortes anualmente, sem a inclusão dos casos de indivíduos soropositivos para HIV (10). E quando o assunto são pessoas coinfetadas simultaneamente

pelo *M. tuberculosis* e pelo HIV, são detectados anualmente 350 mil óbitos. Além disso, existem aproximadamente 500 mil casos de tuberculose multirresistente (MDR), uma forma de tuberculose que não responde aos tratamentos convencionais com medicamentos de primeira linha e, se não for tratada, aumenta o risco de propagação (10).

No Brasil, no ano passado, foram registrados 69 mil novos casos de TB, doença que corresponde à quarta causa de morte por doenças infecciosas no país, e a primeira em pacientes portadores de AIDS. Em todo o mundo, o Brasil está em 17º lugar em número de casos de tuberculose entre os 22 países que possuem alta carga epidemiológica, e ocupa a 22ª posição em taxa de incidência, prevalência e mortalidade entre estes 22 países. Somente em 2010, houve 4,6 mil mortes em decorrência da tuberculose (10). Já no estado do Rio de Janeiro, em 2011, a taxa de incidência foi a segunda mais elevada do país, com quase 60 indivíduos por 100.00 habitantes (Figura 3). (11).

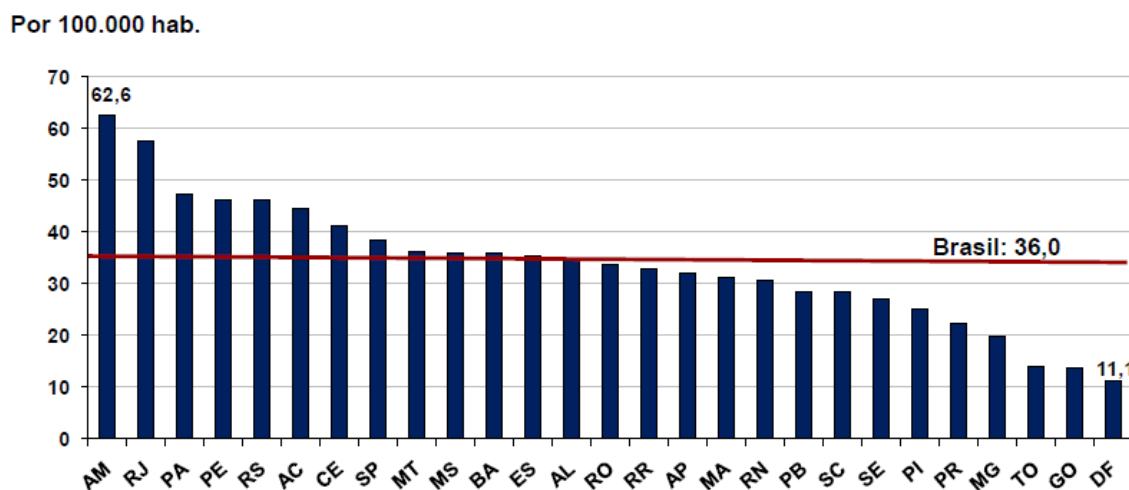


Figura 3: Taxa de incidência de tuberculose por UF (Unidade Federativa). Brasil, 2011.(11).

As metas internacionais estabelecidas pela OMS e pactuadas pelo governo brasileiro são de descobrir 70% dos casos de tuberculose estimados e curar 85% dos casos descobertos. A tuberculose ainda é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. Está intimamente ligada à pobreza e à má distribuição de renda, além do estigma que implica na não adesão dos portadores e/ou familiares/contactantes (12).

Além disso, embora a terapia medicamentosa seja eficaz, requer tratamento com quatro antibióticos por 9 meses, o que em muitas partes do mundo é quase impossível fazer. Tais regimes são repletos de casos de não conformidade, os quais levam à seleção de cepas multi-resistentes. A eficácia dessa complexa terapia depende da existência de uma infra-estrutura de saúde que está além dos meios e experiência de muitas das regiões mais seriamente afetadas no mundo (1).

### 1.3 Aspectos clínicos

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* resulta da inalação de perdigotos contendo os bacilos, os quais são expelidos quando uma pessoa com TB ativa tosse, fala ou espirra. A infecção pelo bacilo pode ou não evoluir para doença. A chance de uma evolução favorável é regida por fatores que podem comprometer o sistema imune como, idade avançada, desnutrição, tabagismo, infecção pelo HIV, neoplasias e outras doenças, além de outras características do agente agressor como, virulência, carga infectante e indução de hipersensibilidade (13).

As pessoas em contato próximo com casos infecciosos (familiares, profissionais de saúde, os detentos) estão em risco elevado de infecção (8). As manifestações clínicas de tosse, expectoração, hemoptise, febre, sudorese noturna, anorexia e perda de peso ocorrem quando a doença se instala efetivamente, ou seja, quando não há controle da infecção, dando início ao processo inflamatório (14).

Possíveis determinantes da virulência, incluindo antígenos secretados, componentes de superfície celular, enzimas envolvidas no metabolismo celular, e reguladores transcricionais já foram descritos. Três problemas principais estão incluídos no estudo da virulência micobacteriana. Primeiro, existem diferentes estágios no curso da tuberculose – estabelecimento inicial da infecção, um período de latência ou dormência, e pós-doença primária, devido à reativação endógena ou reinfecção exógena. Em segundo lugar, a virulência em modelos animais experimentais não se correlaciona estreitamente com a doença humana, e em terceiro lugar, há observações que sugerem que os mecanismos de virulência do *M. tuberculosis* variam de acordo com as linhagens genotípicas de cepas que podem ter se diversificado com adaptações para populações humanas de diferentes constituições genéticas (8).

A TB é uma infecção micobacteriana usualmente pulmonar e que pode levar a grande destruição e disfunção neste órgão. Pode ser vista em adultos e até em crianças, dependendo da idade no momento da infecção. Um entendimento claro da doença e das manifestações morfológicas em vários órgãos pode ser obtido somente pela compreensão da patogênese e impacto da infecção no organismo. Um indivíduo pode estar ou não infectado, ou pode até ter um dos dois tipos da doença. A TB é dividida em dois tipos, primária e secundária. A primária indica que uma pessoa está infectada por TB pela primeira vez. E a secundária é usualmente vista em adultos, após infecção primária na infância. Há um terceiro tipo, “primária-progressiva”, que corresponde a uma evolução direta da TB primária (Figura 4). (8). A partir do foco de inoculação inicial, o bacilo pode invadir correntes sanguínea e linfática e disseminar-se pelo organismo. Dessa forma, pode implantar-se em qualquer outra região do corpo humano e causar doença extrapulmonar. Suas formas mais frequentes são: pleural, meningoencefalite tuberculosa, tuberculose ganglionar periférica, tuberculose osteoarticular, tuberculose geniturinária, tuberculose oftálmica e tuberculose nos infectados por HIV (13).

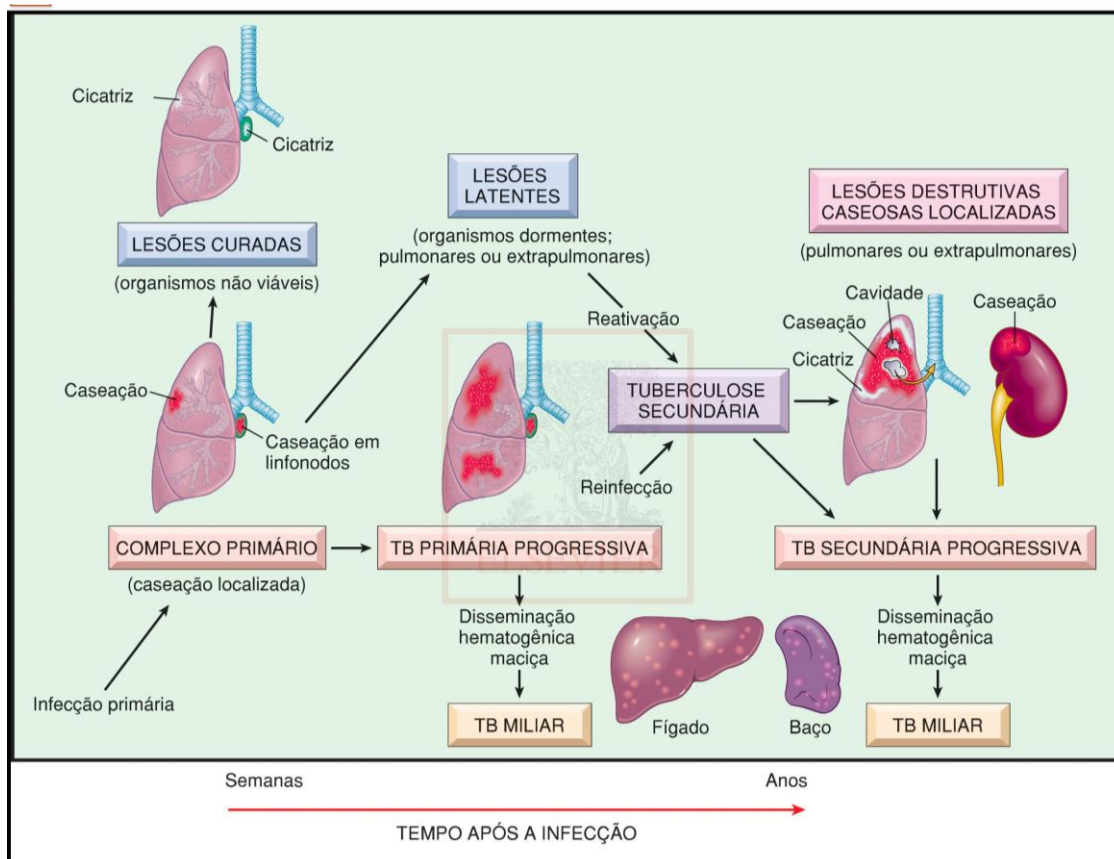


Figura 4: Resumo do espectro de eventos que podem seguir TB primária e secundária, respectivamente (6).

#### 1.4 Aspectos imunológicos: patogênese da tuberculose

A transmissão do patógeno é direta, de pessoa a pessoa, principalmente através do ar. Ao falar, espirrar ou tossir, o doente de tuberculose pulmonar lança no ar gotículas, de tamanhos variados, contendo o bacilo. As gotículas mais pesadas caem no solo e as mais leves podem ficar suspensas no ar por diversas horas. Somente os núcleos secos das gotículas (Núcleo de Wells), com diâmetro de até  $5\mu$  e com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos e aí iniciar a multiplicação (12). É estimado que um paciente bacilífero infecte de 10 a 15 pessoas não-imunossuprimidas na



comunidade com a qual tem contato no período de um ano (13). Habitualmente, parte dos *M. tuberculosis* inalados ficará retida pelos mecanismos físicos de defesa do trato respiratório: cílios nasais, reflexo da tosse e depuração mucociliar. Outra parte poderá transpassar esses mecanismos inespecíficos e se implantar no pulmão ou outros órgãos (13). Por oferecer condições adequadas ao bacilo, o pulmão é o primeiro órgão a ser afetado e na maioria das vezes é onde a doença se localiza. As formas pulmonares dependem da carga infectante e da resposta imune do organismo.

A morte do *M. tuberculosis* ocorre de maneira imediata por diferentes mecanismos microbicidas de macrófagos, incluindo a geração de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) e de oxigênio (ROI). A eficácia destes mecanismos depende da capacidade intrínseca microbicida dos macrófagos alveolares, das características patogênicas da cepa de *M. tuberculosis* inalada, e do microambiente inflamatório no local da infecção (15). Bacilos que sobrevivem, proliferam logaritmicamente dentro de macrófagos alveolares e células dendríticas, e induzem a produção de mediadores imunológicos tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p80, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que ativam macrófagos para induzir a morte precoce bacteriana (16, 17). A produção de IL-12 e IL-18 por macrófagos alveolares e DCs induz a produção de IFN- $\gamma$  por células NK, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (15, 18, 19, 20). Células inflamatórias periféricas incluindo monócitos, neutrófilos e DCs são recrutadas para o pulmão (21, 22). As DCs são ativadas através de sinalização de TLRs, e monócitos se diferenciam em macrófagos efetores que produzem substâncias microbicidas incluindo TNF- $\alpha$ , que contribuem para o controle do crescimento do *M. tuberculosis*, e formação de granuloma (23).

Como resultado da estimulação crônica por citocinas, os macrófagos se diferenciam em células epitelioides e se tornam células gigantes ao se fundirem (24). A arquitetura do granuloma caracteriza-se pela agregação de células T e macrófagos infectados que contêm o *M. tuberculosis* impedindo a sua propagação (24, 25, 26). Além das citocinas inflamatórias, a presença de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, e CXCL10 é crucial para o recrutamento das células inflamatórias para formar os granulomas (24, 27, 28,

29). Estes mecanismos permitem o desenvolvimento de uma infecção primária localizada, que eventualmente pode tornar-se uma infecção estável assintomática (também conhecida como latente). Em mais de 90% das infecções latentes, as áreas caseosas centrais contendo bacilos vivos são isoladas pelas paredes dos granulomas. Um ciclo ativo de ativação celular e supressão impede a replicação e disseminação do *M. tuberculosis* (16, 30). Dessa forma, nos 10% dos casos restantes em que o sistema imune não consegue conter a infecção pelo *M. tuberculosis*, ocorre a conhecida tuberculose pós-primária. Como resultado da persistência das micobactérias, associada a falhas no sistema de vigilância imunológica, a infecção latente pode ser reativada induzindo dano dos brônquios proximais e a disseminação do *M. tuberculosis* para outras áreas do pulmão (31).

Um aspecto chave da defesa do hospedeiro contra a tuberculose é a resposta adaptativa de células T a antígenos específicos. Tem se tornado cada vez mais claro que as células T CD4<sup>+</sup> (32, 33) e a subpopulação citotóxica de CD8<sup>+</sup> contribuem para a imunidade protetora contra o *M. tuberculosis* (34). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> contribuem para a defesa do hospedeiro pela liberação de citocinas Th1 e a interação coordenada de moléculas antimicrobianas, incluindo a via mediada por perforina e granulicina (35, 36). A granulicina é uma proteína expressa em grânulos intracelulares de subpopulações de linfócitos T citotóxicos, incluindo as células NK (37), T CD4<sup>+</sup> (38, 39), T CD8<sup>+</sup> (35, 36, 40), NKT (41) e células TCRγδ (42). As funções principais são a lise de células tumorais suporte de inflamação (43, 44, 45) e morte de microorganismos patogênicos (35, 37). O conhecimento sobre a relevância da via perforina/granulicina na atividade antimicrobiana *in vivo* é limitado. Alguns trabalhos mostraram que a expressão de granulicina em células T efetoras diminuiu durante o tratamento com anti-TNF em pacientes portadores de doenças autoimunes. Esta população possui atividade antimicrobiana e pode ser crítica para a manutenção de latência em pacientes infectados com *M. tuberculosis* (46).

A imunidade celular é o principal mecanismo de defesa contra o *M. tuberculosis*. A produção de IFN-γ e a resposta imune predominante do tipo I são largamente consideradas como biomarcadores da imunidade protetora

contra TB. No entanto, indicadores adicionais são necessários para definir a susceptibilidade contra TB. Indicadores candidatos são moléculas derivadas de células T, como mediadores micobactericidas (granulinas) que estão relacionados com a proteção e melhora clínica em doenças micobacterianas e, possivelmente, moléculas de outras populações de células imunes, como macrófagos e granulócitos (39).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina crucial da imunidade Th1, e essencial para resposta a bactérias intracelulares, incluindo *M. tuberculosis* (47). A função do IFN- $\gamma$  na resposta a agentes patogênicos tem sido extensivamente estudada e é crítica para a regulação de respostas de células T em doenças micobacterianas (48). O IFN- $\gamma$  é produzido por células T ativadas, células NK e macrófagos, sendo essencial para a ativação de fagócitos e a apresentação de antígeno, e promovendo a proliferação, adesão e apoptose celular. Em macrófagos, o IFN- $\gamma$  induz ativação metabólica contribuindo para a produção de NO e ROIs (48). Além disso, os macrófagos ativados produzem moléculas imunomoduladoras e quimiotáticas que promovem regulação positiva dos receptores de TNF- $\alpha$  e NRAM-1. A produção de grandes quantidades de ROI e NO pelas células inatas é considerada um dos mais importantes efeitos do IFN- $\gamma$ . Em modelo murino de infecção por *M. tuberculosis*, o NO é essencial para a morte do bacilo por macrófagos. Em camundongos homocigotos geneticamente deficientes para a síntese de NO (iNOS<sup>-/-</sup>), a infecção com *M. tuberculosis* tem uma rápida progressão e uma maior taxa de mortalidade (49, 50). Defeitos em vias de sinalização de IFN- $\gamma$  observados em camundongos geneticamente deficientes provocam alta susceptibilidade a infecções micobacterianas. Nestes camundongos também não se desenvolvem granulomas após a infecção pelo *M. tuberculosis* em aerossol, com falhas significativas na ativação de macrófagos (51).

## 1.5 Diagnóstico da tuberculose: TB ativa

### 1.5.1 Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico pode ser feito pelo método direto (baciloscopia) ou bacteriológico, que identifica o bacilo como álcool-ácido-resistente (BAAR). A baciloscopia direta de escarro é um exame rápido, com alta especificidade, elevado valor preditivo positivo e baixo custo. Entretanto, a baciloscopia apresenta baixa sensibilidade (40% - 60%). No Brasil o padrão é a coloração por Ziehl-Neelsen. A coloração pela auramina, utilizando microscópio de imunofluorescência é indicada para triagem em laboratórios que processam de 30-50 amostras/dia, reduzindo o tempo de leitura dos negativos. Devem ser coletadas duas amostras de escarro espontâneo em potes plásticos descartáveis, uma no momento que o doente suspeito procura o atendimento médico e outra pela manhã ao acordar. Indivíduos sem expectoração espontânea e com telerradiografia de tórax suspeita de TB devem ser submetidos à indução de escarro ou broncoscopia para colheita de material para detecção de *M. tuberculosis*. (52).

A cultura permite o isolamento e a identificação do *M. tuberculosis*, e a realização do teste de sensibilidade. Os meios sólidos mais utilizados e recomendados são o Löwenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh. Este último é recomendado para utilização nos laboratórios de menor complexidade porque não requer o uso de centrífuga. Para o resultado negativo da cultura são necessários 60 dias, e seu limite de detecção é de 100 bacilos por mL de espécime, portanto permitindo um aumento no número de diagnósticos em o diagnóstico de 20% a 40%, com relação ao uso isolado de esfregaços. A cultura em meio sólido tem como limitação o tempo necessário para o resultado (4 - 6 semanas). Por isso, quando possível, deve ser utilizado o meio líquido através de sistemas automatizados não radiométricos, para maior rapidez no resultado (10 - 40 dias). Idealmente a cultura com teste de sensibilidade deveria ser realizada em todos os casos, mas atualmente, ela só é indicada nos casos persistentes negativos na baciloscopia direta, no retratamento, nos

pacientes HIV positivos, nas populações vulneráveis (detentos, profissionais de saúde, moradores de rua, populações institucionalizadas em albergues, hospitais psiquiátricos e asilos) e nos casos extrapulmonares. Para as amostras extrapulmonares, o material coletado por biópsia deve ser também armazenado em água destilada para viabilizar a realização da cultura. A identificação de espécies consiste em distinguir as micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* das outras micobactérias não tuberculosas (MNTB). (52).

O teste de sensibilidade tem as mesmas indicações de realização da cultura. Os métodos padronizados utilizados no Brasil são: método das proporções, razão de resistência e concentração absoluta. Alguns laboratórios de referência utilizam sistemas automatizados a partir de culturas líquidas para reduzir o tempo do resultado (10 dias). (52).

#### 1.5.2 Diagnóstico radiológico

Conforme Capone, a radiografia de tórax é um dos principais meios de diagnóstico de TB primária embora alterações pulmonares não sejam demonstradas em até 15% dos casos. Na tuberculose pós-primária, observa-se a presença de imagens correspondentes a cavidade única, ou diversas cavidades com diâmetros em torno de 2 cm, localizadas mais comumente nos seguimentos apicais e dorsais. Em pacientes com sintomas respiratórios, mas com baciloscopia negativa e radiografia inconclusiva, torna-se indicada a realização de tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) para esclarecer o diagnóstico (52).

## 1.6 Diagnóstico da tuberculose: TB latente

Nem todas as formas clínicas de TB são passíveis de confirmação bacteriológica e dada a possibilidade de ativação de um foco infeccioso latente, é importante poder diferenciar os portadores de bacilos latentes dos portadores de formas paucibacilares. O diagnóstico efetivo e o tratamento de tuberculose latente (TBL) para evitar a progressão da TB têm sido utilizados em muitos países, como os Estados Unidos, como estratégia de controle, prevenção e eventual eliminação da TB. Rotineiramente, o diagnóstico de TBL é feito através do teste tuberculínico (TST, do inglês *Tuberculin Skin Test*). Este teste é baseado na reação de hipersensibilidade tardia a certos componentes antigênicos do bacilo. Os linfócitos T sensibilizados pela infecção prévia com o *M. tuberculosis* são recrutados para o local da inoculação e lá liberam citocinas. Essas irão causar vasodilatação, deposição de fibrina e recrutamento de outras células inflamatórias ao local, induzindo eritema e endureção do tecido na área da injeção (13). O teste positivo reflete infecção pelo *M. tuberculosis*, mas também pode indicar infecção por outras micobactérias ou vacinação pela BCG, levando a um resultado falso-positivo, devido a sua baixa especificidade. Pode também levar a resultados falso-negativos em grupos de alto risco, como pacientes imunossuprimidos, crianças e pacientes com infecção latente, levando a necessidade de buscar outros testes (53).

Há uma década, uma nova geração de testes específicos para infecção por *M. tuberculosis* foi introduzida. Dois testes comerciais estão atualmente disponíveis, o QuantiFERON TB Gold (QFT-G; Cellestis / Qiagen, CA, EUA) baseado no ELISA, e o ELISPOT-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido). Estes ensaios de liberação de IFN- $\gamma$  (IGRA, do inglês *Interferon Gamma Release Assay*) são ensaios de resposta imune celular (CMI), que contam com medição de respostas das células T *in vitro* aos peptídeos-antígeno específicos para *M. tuberculosis* (54, 55). Os IGRAs baseiam-se em cinco componentes essenciais: peptídeos antígeno-específicos para *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7), células apresentadoras de antígenos (APC), uma incubação de 16 – 24 horas a 37°C, células T (56, 57); e um

biomarcador do reconhecimento imune, o IFN- $\gamma$ . Dependendo dos níveis de IFN- $\gamma$  é possível determinar um ponto de corte separando indivíduos positivos de negativos (58, 59).

Os IGRAs oferecem vantagens práticas e teóricas em relação ao TST. Em termos práticos, para realizar o IGRA basta uma visita do paciente em que será feita a coleta de sangue. Entretanto, para realização do TST são necessárias duas visitas, a primeira para aplicação e uma segunda que ocorre após 48-72h para leitura da resposta cutânea. Além disso, o IGRA utiliza uma medida objetiva de produção de IFN- $\gamma$  em oposição ao TST que usa como referência a resposta de DTH. Enquanto o IGRA utiliza peptídeos específicos do *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB7.7), o TST utiliza proteínas purificadas derivadas do *M. tuberculosis*, mas não restritas a este bacilo. Essas proteínas derivadas contêm numerosos antígenos de *M. tuberculosis* que têm reação cruzada com BCG e muitas micobactérias não tuberculosas. Os peptídeos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 são encontrados em poucas micobactérias não tuberculosas e não são encontrados no BCG (60). O IGRA não altera a história clínica do paciente, isto é, não tem efeito de reforço, pois não expõe o indivíduo ao antígeno. A injeção do PPD para o teste de TST pode impulsionar respostas de TST subsequentes, principalmente em pessoas que tenham sido infectadas com micobactérias não tuberculosas ou vacinadas com BCG. Em comparação com o TST, o IGRA é menos afetado pelo efeito reforço do TST.

Vários artigos e revisões na literatura fizeram comparações sistemáticas sobre o desempenho de IGRA em comparação ao TST. Estes trabalhos foram conduzidos em diferentes grupos de estudo incluindo adultos, crianças, pessoas imunodeficientes, imigrantes, contatos de pacientes de TB e profissionais da área de saúde. Entretanto, essas pesquisas foram limitadas, primeiro pela inexistência de um método de diagnóstico para TBL com padrão-ouro. Para medida de sensibilidade, pacientes com TB são usados como controle e para especificidade utiliza-se pessoas sem risco de infecção pelo bacilo como padrão. A segunda limitação da maior parte dos estudos conduzidos é o tamanho de certos grupos (como crianças e imunocomprometidos) que possuem uma amostragem pequena fornecendo resultados estatísticos inadequados. Apesar das limitações, os IGRAs parecem

ser não menos sensíveis e específicos que o TST, e mais específicos que o TST em pessoas que foram vacinadas com BCG (61).

A propriedade mais importante dos testes para determinar TBL é a capacidade de prever quais pacientes irão eventualmente progredir para TB ativa. Nesse aspecto, o teste de TST possui um fraco desempenho, com somente 5 – 10% de pessoas com resultado positivo de TST desenvolvendo posteriormente a TB ativa (62). A análise da capacidade preditiva dos IGRAs é dificultada por questões éticas em estudos prospectivos, uma vez que em vários países indivíduos saudáveis com resultados positivos de IGRA devem ser encaminhados para profilaxia.

Outros biomarcadores potenciais são expressos em conjunto com IFN- $\gamma$ . O CXCL10 (IP-10) em particular, tem mostrado resultados promissores, e é produzido em grandes quantidades, permitindo o desenvolvimento de plataformas de teste novos e simplificados, como o “lateral flow” para detecção destes biomarcadores (63). O CXCL10 é uma quimiocina expressa pelas APCs e um importante indutor de respostas inflamatórias (64, 65). O CXCL10 é expresso por células infectadas com vírus e bactérias, mas também pode ser induzido em níveis elevados como parte da resposta imune adaptativa. Neste caso, a secreção de CXCL10 é iniciada quando as células T reconhecem o seu peptídeo cognato apresentado pela APC. A secreção de CXCL10 é acionada por múltiplos sinais, principalmente IFN- $\gamma$  derivado de células T, mas também IL-2, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-27, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  autócrinas derivadas de APCs. O TNF- $\alpha$  é um fraco indutor de IP-10, mas um potente indutor sinérgico quando atua com os interferons. Devido às muitas vias diferentes que pode levar à secreção de CXCL10, este pode ser considerado um marcador de jusante para marcadores de leitura típicos em ensaios de CMI, tais como IL-2 e IFN- $\gamma$  (66 - 71). Portanto, o CXCL10 é uma alternativa promissora em ensaios de CMI (63).



## 1.7 Tratamento

A primeira ação efetiva do poder público contra a tuberculose no Brasil data de 1907 e foi proposta por Oswaldo Cruz, então diretor geral de saúde pública. Em 1920, criou-se a Inspetoria de Profilaxia da Tuberculose, que priorizou a descoberta e o tratamento adequado dos doentes. A seguir, em 1926, o Departamento Nacional de Saúde Pública criou modelo centralizado de ações profiláticas, hospitalares e laboratoriais, coordenadas pelo Setor público. Até a década de 40, quando ainda não havia medicamento efetivo, o tratamento era hospitalar, com o uso de técnicas cirúrgicas, tais como o pneumotórax. Com a descoberta da estreptomicina, em 1944, seguida pela da isoniazida e pela do ácido para-amino-salicílico, inicia-se a era quimioterápica da tuberculose. O otimismo inicial, quando passou a ser possível curar a maior parte dos doentes, começou a ser abalado pela descoberta de resistência bacteriana aos fármacos empregados. Isso fez com que em 1964, a Campanha Nacional contra a Tuberculose (CNCT), fundada em 1946, passasse a definir normas para o combate à enfermidade, padronizando os esquemas terapêuticos de acordo com uma classificação prognóstica dos doentes tuberculosos (72).

A tuberculose é uma doença grave, porém curável. Se o esquema medicamentoso for adequado, e as doses forem tomadas regularmente pelo tempo suficiente, praticamente 100% dos doentes poderão ser curados. No Brasil, os esquemas terapêuticos são padronizados e adequados às diferentes situações clínicas. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) é responsável pelas normas de prevenção, diagnóstico, tratamento e pela distribuição dos medicamentos, que são fornecidos, gratuitamente, a todos os doentes registrados e acompanhados nas Unidades de Saúde (US). (72).

Atualmente, há um número razoável de medicamentos (Tabela 1) efetivos para o *M. tuberculosis*. Na rotina os mais utilizados são a rifampicina, a isoniazida, a pirazinamida, o etambutol, a estreptomicina e a etionamida. De um modo geral, os medicamentos interferem com o sistema enzimático do *M. tuberculosis* ou bloqueiam a RNA-transcriptase, no momento da replicação do

DNA, interferindo na construção protéica. A finalidade do esquema medicamentoso é atuar em diferentes estágios do metabolismo bacilar, visando potencializar o efeito destrutivo (72).

Rifampicina	Tiosemicarbazona
Isoniazida	Kanamicina
Pirazinamida	Morfazinamida
Etambutol	Ofloxacina
Estreptomicina	Terizidona
Etionamida	Clofazimina
Cicloserina	Ácido paraminosalicílico
Capreomicina	

Tabela 1: Medicamentos efetivos sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, padronizados no Brasil - Tratamento da tuberculose. Fonte: Campos HS. Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pulmão RJ 2007;16(1):21-31.

### 1.8 Alterações em expressão gênica na patogênese da tuberculose

Vários fatores do hospedeiro determinam o resultado da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, e portanto, susceptibilidade e patogenia. Um trabalho de Jacobsen e cols. de 2007 (76), apontou biomarcadores através do estudo de comparação do perfil de genes em células mononucleares do sangue periférico (CMS) de pacientes com tuberculose e indivíduos saudáveis infectados pelo *M. tuberculosis* por análises de microarranjo (microarray). Os genes candidatos (lactoferrina (LCF), CD64 e GTPase 33A associada a RAS) expressos diferencialmente foram derivados predominantemente de monócitos compreendendo moléculas envolvidas em inflamação. Observou-se que, em CMS de indivíduos saudáveis infectados pelo *M. tuberculosis* em relação às CMS de pacientes com tuberculose, a expressão de GTPase diminuiu, enquanto que as

expressões de LCF e CD64 aumentaram. Dessa forma, as análises de microarranjo com qPCR revelaram que os genes CD64, LCF, e Rab33A são possíveis candidatos para a discriminação entre pacientes com TB e doadores saudáveis (76). Baseando-se nestes estudos, o presente trabalho pretendeu avaliar os níveis das mensagens de tais marcadores, como biomarcadores potenciais de atividade inflamatória em tuberculose pulmonar.

Uma característica marcante de CD64 (conhecido também por receptor I de Fc $\gamma$ ) é sua alta expressão em macrófagos inflamatórios, podendo ser regulado positivamente por IFN- $\gamma$  durante as infecções bacterianas. A expressão de CD64 na superfície dos neutrófilos foi recentemente proposta como um marcador precoce de infecção bacteriana (73). O CD64 é capaz de induzir endocitose, fagocitose, “burst” respiratório, e citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC) em monócitos, macrófagos e granulócitos, sendo portanto uma ferramenta promissora para o diagnóstico de infecções (74,75 e 77). Um papel crucial de CD64 em doenças infecciosas é apoiado por estudos que mostram a regulação da expressão do gene em macrófagos e células dendríticas por citocinas, tais como IFN- $\gamma$  (78) e interleucina-10 (79). O IFN- $\gamma$  é um mediador chave de defesa anti-micobacteriana no hospedeiro (80, 81). É também um alvo importante da estratégia de sobrevivência do *M. tuberculosis*, que bloqueia a indução de várias respostas transcricionais incluindo a de CD64 (82). Curiosamente, a expressão da proteína CD64 foi descrita como aumentada em monócitos de pacientes com tuberculose (83).

A lactoferrina (LCF) é uma molécula transportadora com elevada afinidade para o ferro, a qual modula a defesa do hospedeiro competindo pelo ferro com os microorganismos (84). Um efeito direto da LCF na infecção por *M. tuberculosis* foi revelado em um modelo murino, no qual a correção da sobrecarga de ferro pela LCF corrigiu a maior susceptibilidade à tuberculose observada em camundongos geneticamente deficientes para  $\beta$ -2-microglobulina (85). Ou seja, maior expressão de LCF em células mononucleares do sangue periférico (CMS) dos pacientes de TB poderia restringir acesso micobacteriano ao ferro.

O Rab33A é um membro da família de GTPase associada a Ras que está provavelmente envolvido na regulação do tráfego intracelular (86). Num estudo de 2005, foi demonstrado que a proteína Rab33A possui baixa

expressão em CMS de pacientes com TB, e que é preferencialmente expressa em linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A indução da expressão de Rab33A depende de ativação de receptores de células T (87). Em adição a estes genes, vale ressaltar algumas moléculas a seguir que podem ser promissoras no diagnóstico para doença em tuberculose.

O OASL é uma molécula composta por uma unidade de OAS (2'-5' oligoadenilato sintetase) acoplada no seu terminal C com dois ligantes de ubiquitinas. O OASL humano é desprovido de atividade catalítica 2'-5'OAS típica (88). A família 2'-5' oligoadenilato sintetase (OAS) consiste em três genes que codificam enzimas ativas OAS (OAS 1-3) e um gene OASL que codifica uma proteína inativa. A transcrição de todos os quatro membros desta família é ativamente induzida por interferon (IFN) (89). Trabalhos anteriores estudaram a relação do gene OASL com infecções virais e por algumas bactérias, mas até agora nenhuma tentativa para analisar sistematicamente a expressão do gene OASL durante a infecção por *M. tuberculosis* ocorreu. Esta relação pode proceder uma vez que ambas as respostas imunes, viral e bacteriana, possuem o perfil Th1.

PD-L1, também conhecido como CD274 e B7-H1, é uma molécula imunorreguladora que atua em grande parte por meio da interação com PD-1 (90). PD-1 interage com seus ligantes PD-L1 e PD-L2 para enviar sinais inibidores que regulam células T e outras respostas, ajudando assim a manter o equilíbrio entre a imunidade efetiva, tolerância e imunopatologia. PD-L1 é expressa numa variedade de tipos de células diferentes, incluindo as células T e células mielóides, tais como DCs e monócitos (90). Interações PD-L1 / PD-1 podem desempenhar um papel em uma diversificada gama de configurações, incluindo doenças infecciosas. Em um quadro infeccioso, interações PD-L1/PD-1 são frequentemente associadas com a cronicidade, particularmente durante a infecção viral (90). PD-L1 suprime a proliferação de células T e função efetora, através da ligação com PD-1, mais notadamente pela exaustão das células T CD8<sup>+</sup> durante infecções virais crônicas e também em células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com HIV ou Hepatite C (91 - 95). As interações PD-L1/PD-1 podem também desempenhar um papel na cronicidade de algumas infecções bacterianas (96, 97). A indução de expressão de PD-1 e IFN- $\gamma$  em células T de sangue periférico e cavidade pleural de pacientes com tuberculose foi

observada em resposta a estímulo com sonicação de *M. tuberculosis* H37Rv. Além disto, anticorpos bloqueadores anti PD-1/PD-L1/PD-L2 induziram aumento de produção de IFN- $\gamma$  por células T, e de função citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas de sangue periférico, e de células mononucleares de derrame pleural *in vitro* (98). Achados similares foram relatados recentemente para as células NK obtidas a partir de derrame pleural e sangue periférico de pacientes com TB (99). No entanto, a expressão de PD-1 e os seus ligantes PD-L1 e PDL2 durante a TB continua indefinida, dificultando assim a compreensão de como as interações PD-L1/PD-1 podem regular a resposta imune a *M. tuberculosis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Detectar biomarcadores promissores durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, no intuito de identificar precocemente indivíduos expostos em início de um processo inflamatório, evitando o adoecimento e a evolução para tuberculose ativa.

### 2.2 Objetivos específicos

A- Avaliar o potencial diagnóstico dos biomarcadores IFN- $\gamma$  e CXCL10 induzidos por estímulo *M. tuberculosis*-específico para detecção de infecção latente por *M. tuberculosis*, em comparação com o TST, e também sua positividade em pacientes com tuberculose pulmonar.

B- Avaliar a frequência de positividade para os biomarcadores IFN- $\gamma$  e CXCL10 induzidos por estímulo *M. tuberculosis*-específico em pacientes com tuberculose pulmonar.

C- Avaliar a expressão de CD64 na superfície celular de monócitos e neutrófilos dos indivíduos com diferentes níveis de exposição ao *M. tuberculosis*.

D- Comparar níveis de expressão dos genes-alvo, CD64 / LCF / GTPase / CXCL10 / PD-L1 e OASL em células de sangue não-fracionado de indivíduos com diferentes níveis de exposição ao *M. tuberculosis*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 População estudada e critérios de inclusão

As amostras biológicas, sangue não-fracionado e plasma, utilizadas neste trabalho foram colhidas no período de junho de 2011 a maio de 2012. Os indivíduos que compuseram a população de estudo tinham idade de 18 a 65 anos. Do total de 81 voluntários avaliados neste trabalho, 22 eram pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB), 29 indivíduos saudáveis infectados (TBL), e 30 controles saudáveis não-infectados (NE), (Tabela 2). Os grupos tiveram acompanhamento no Serviço de Pneumologia e Tisiologia do HUPE (Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ - Brasil), foram examinados quanto aos sintomas clínicos da tuberculose.

Os indivíduos saudáveis infectados (tuberculose latente) foram recrutados mediante um teste de PPD positivo ( $PPD \geq 5\text{mm}$ ). Os diagnósticos dos pacientes para TB ativa foram confirmados através de análise da radiografia pulmonar, teste de BAAR (Bacilo álcool-ácido resistente) pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen; isolamento laboratorial de *M. tuberculosis* em cultura para micobactérias em amostra respiratória (teste de escarro espontâneo ou induzido) com o teste de sensibilidade. Os pacientes e voluntários infectados foram recrutados e avaliados antes do início de qualquer tratamento antimicobacteriano ou quimioprolático. Para atender aos critérios finais de inclusão no estudo, voluntários saudáveis não infectados eram negativos no teste de PPD ( $PPD < 5\text{mm}$ ).

Pacientes que, eram gestantes ou imunodeprimidos foram excluídos deste estudo. O desenvolvimento deste projeto e o termo de consentimento de estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). Foram obtidos os Termos de consentimentos assinados pelos participantes no projeto antes da punção venosa.

Tabela 2: Características dos pacientes e controles saudáveis.

Grupos	N	Razão H / M	Média de Idade	18 a 25 anos	26 a 45 anos	46 a 65 anos
NE	30	12 / 18	41,96	0	17	13
TBL	29	11 / 18	42,14	2	14	13
TB	22	16 / 7	40,23	4	11	7
TOTAL	81	39 / 42	41,44	6	42	33

### 3.2 Teste cutâneo tuberculínico

Os voluntários que participaram do estudo foram submetidos ao teste do PPD, como um dos critérios para avaliar o grau de exposição prévia ao *M. tuberculosis*. Nessa prova, uma solução contendo extrato protéico purificado (PPD), tuberculina, foi injetada intradermicamente no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1ml. A cepa comercial utilizada foi a RT23, e foram injetadas intradermicamente 2 unidades de tuberculina (2 UT), cuja capacidade estimuladora guarda equivalência com 5 UT de PPD-S, utilizado em alguns países (13). A leitura da reação foi realizada 72 h após a injeção. A interpretação do teste foi feita com base na medida da área de endureção. O teste foi considerado negativo quando a medida foi menor ou igual a 4 mm. Os indivíduos que tiveram leitura a partir de 5 mm foram considerados positivos.

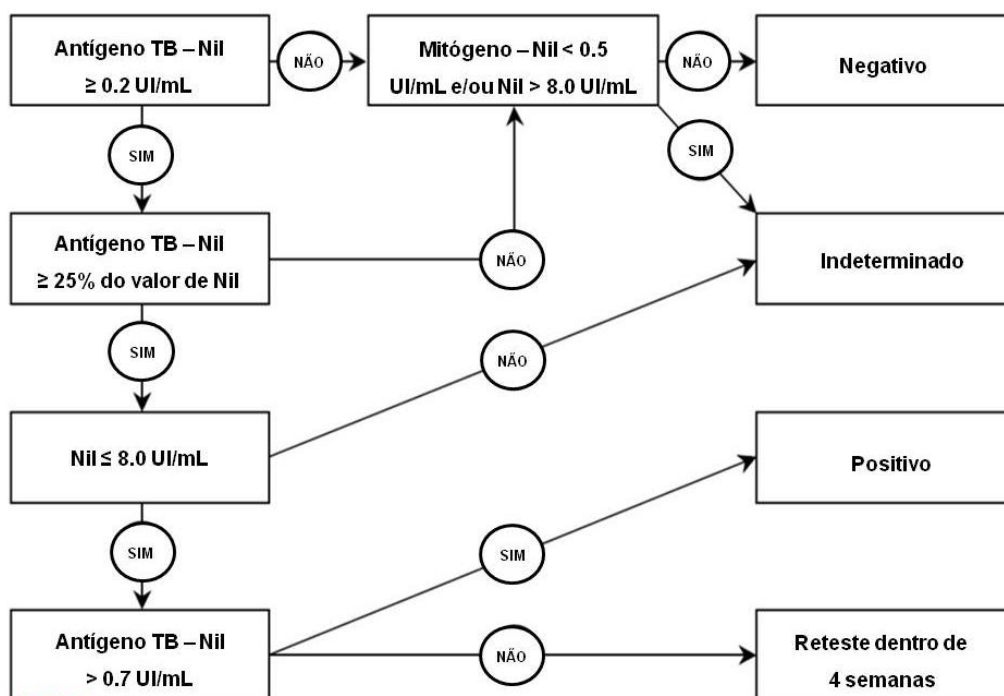


### 3.3 Ensaio para dosagem de IFN- $\gamma$

Após a coleta de sangue periférico, nos tubos do Kit Quantiferon TB Gold Tubes (Cellestis, Austrália. Cat.: 10338930074; Nil, Mitógeno, Antígeno TB), e incubação a 37°C entre 16 e 24 horas, os plasmas das culturas estimuladas ou não, foram coletados e submetidos ao ELISA específico para a dosagem dos níveis de IFN- $\gamma$ , processado segundo instruções do fabricante, (kit Quantiferon TB Gold Elisa Celestis, Austrália. Cat.: 10338930072)

O QuantiFERON TB Gold é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza um grupo de peptídeos derivados das proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7, a fim de estimular as células no sangue não-fracionado e heparinizado. A detecção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por ELISA é usada para identificar respostas *in vitro* a estes peptídeos antigênicos, expressos pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O QuantiFERON TB Gold IT é um teste indireto de infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e deve ser usado em conjunto com outros dados clínicos e epidemiológicos para se chegar a um diagnóstico (Protocolo do Kit QuantiFERON TB Gold – Cellestis).

Os níveis da citocina IFN- $\gamma$  em densidade óptica - D.O foram lidos utilizando filtro de 450nm (filtro de referência 620nm) em leitor de ELISA Mindray (modelo MR-96A) e a interpretação foi feita pelo programa Quantiferon TB Gold Analysis Software, versão 2.6. Os resultados foram expressos em UI/mL, após análise no software *Origin MicroCal (Versão 3.0)*.



Fluxograma 1: Esquema representativo para interpretação do resultado do teste de Quantiferon TB Gold (adaptado da referência 100).

### 3.4 Ensaio para dosagem de CXCL10 (IP-10)

Os níveis de CXCL10 foram medidos em duplicatas de plasmas coletados dos tubos do Quantiferon TB Gold, em ausência de estímulo, com antígeno e mitógeno, conforme anteriormente descrito para detecção de IFN- $\gamma$ . O Kit utilizado para dosagem de CXCL10 foi o Human CXCL10 (R&D Systems, EUA – Cat.: DY266).

Resumidamente, 100  $\mu$ L de anticorpo de captura (anticorpo monoclonal de camundongo anti-CXCL10 humana), na concentração recomendada, foram adsorvidos em placas de poliestireno com 96 poços de fundo plano (NUNC Maxisorp, Roskilde, Dinamarca). Após incubação “overnight” ou por 12 hs, os anticorpos em excesso foram lavados com um tampão de lavagem (tampão salino com fosfato e detergente tween 0,05% - PBST). As amostras, na diluição de 1:10, foram adicionadas às placas, que foram incubadas por 2 hs. Em seguida as placas foram lavadas novamente com PBST. As placas foram então incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) por 20 minutos, e posteriormente o excesso de conjugado foi removido por lavagem com PBST. Em seguida, 100  $\mu$ L de tetra-metil benzidina (TMB) foram utilizados como substrato em incubação de 20 minutos. A reação foi interrompida por adição de 50 $\mu$ L de solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os níveis de CXCL10 quantificados utilizando filtro de 450nm (filtro de referência 540 – 570nm) em leitor de ELISA (Molecular Devices – Modelo: Spectra Max 190) e os resultados foram expressos em pg/mL, após processamento dos dados com o software SoftMax Pro (Versão 4.8), e os gráficos foram desenhados com o software *Origin MicroCal* (Versão 3.0).

Os pontos de corte (‘cut off’) para CXCL10 após estímulo com os antígenos específicos de *M. tuberculosis* e mitógeno foram definidos como 300 pg/mL e 200 pg/mL, respectivamente (3, 101). Os indivíduos com valores  $\geq$  300 pg/mL para os antígenos de TB (após subtração Antígeno TB - Nil), independentemente da resposta do mitógeno foram considerados positivos; resultados  $<$  300 pg/mL para os antígenos de TB (Antígeno TB - Nil) e com mitógeno  $\geq$  200 pg/mL foram considerados como negativos. E quando a

resposta ao antígeno TB (Antígeno TB - Nil) tinha valor < 300 pg/mL associada a mitógeno < 200 pg/mL, os indivíduos avaliados foram considerados como indeterminados (3, 102).

### 3.5 Expressão de CD64 em leucócitos

O sangue periférico heparinizado (50 UI/mL) foi coletado e dele retirada uma alíquota de 50 µL que foi utilizada na marcação das células com anticorpos monoclonais específicos do kit Leuko 64 (Trillium Diagnostics, LLC - EUA). O sangue foi armazenado na geladeira por até 48 h antes das marcações conforme instruções do fabricante.

O sangue não-fracionado foi marcado de acordo com as instruções do fabricante. A Solução de Lise Trillium (10X) (Reagente B) foi diluída numa proporção de 1:10 em água desionizada. O volume obtido foi suficiente para o número previsto de testes (foi necessário 1.0 mL para cada amostra). A Solução de Lise Trillium diluída, para utilização estava entre 20°C e 37°C. Foram adicionados 50µL do Reagente A que contém uma mistura de anticorpos monoclonais: anti-CD64 marcados com fluoresceína (FITC) (clones 22 e 32.2) e anti-CD163 PE (ficoeritrina) (clone Mac2-158). O anti-CD163, um anticorpo dirigido contra um antígeno específico de monócito, aumenta a especificidade da identificação de subpopulações de leucócitos. As amostras com anticorpos monoclonais previamente adicionados foram incubadas durante 10 minutos protegidas da luz. Após a marcação, foi adicionada a solução B que consiste em um tampão de lise previamente diluído, e depois de 15 minutos, foram adicionados 5 µL da solução C que contém as esferas marcadas com StarFire Red e FITC. A análise por citometria de fluxo das amostras foi efetuada num período máximo de 6 horas após a marcação das células com os anticorpos monoclonais.

As amostras marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur da *Becton Dickinson* (BD) utilizando o programa *CellQuest Pro*. O citômetro de fluxo FACSCalibur BD fica localizado na Unidade de Citometria de

Fluxo (UCF), do Laboratório de Imunopatologia (LIP) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Para análise das amostras seguimos o seguinte protocolo:

- (1) Criação de Dot Plots: FSC x SSC; SSC x CD64 FITC; SSC x CD163 PE; CD64 FITC x CD163 PE.
- (2) Criação de Histogramas: CD64 FITC (FL1); CD163 PE (FL2).
- (3) Ajuste dos detectores conforme a bula do fabricante.
- (4) Com o aparelho previamente calibrado realizamos a leitura das amostras.

O programa QuantiCALC (Trillium Diagnostics, EUA) foi utilizado para análise e linearização dos resultados que são apresentados como índice de expressão de CD64 e CD163. O cálculo do índice é lote-específico e foi realizado da seguinte forma:  $\text{CD64 índice} = \text{fator de calibração da esfera} \times (\text{mediana da intensidade de fluorescência de neutrófilos} / \text{média da intensidade de fluorescência das esferas})$ .

A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma. Dos casos avaliados, aqueles com índice de CD64 de neutrófilos  $< 1,0$  são considerados normais e estão presentes em indivíduos saudáveis, entre  $1,0 < x < 3,0$  estão desenvolvendo um processo inflamatório e os casos  $> 3,0$  são característicos de inflamação aguda sistêmica.

### **3.6 Extração de RNA total**

O isolamento do RNA de sangue não-fracionado foi realizado com Kit de Reagentes Paxgene (Catálogo: 762174). Este kit foi usado em conjunto com os Tubos de Coleta de sangue Paxgene (Catálogo: 761125), que após a coleta foram armazenados em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração do RNA. O ensaio foi realizado segundo instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). E a análise da integridade das amostras de RNA foi

verificada por Eletroforese em gel de agarose. Estes procedimentos foram pré-requisitos para posterior síntese de cDNA, e análise de expressão gênica por ensaio de PCR.

### **3.7 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

O RNA total foi extraído com o kit Paxgene (Qiagen, EUA) e 500ng foram reversamente transcritos em cDNA utilizando 200 U da enzima Superscript III e 0,5 µg de oligo-dT de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, EUA).

### **3.8 Reação de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)**

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com apoio da Plataforma de PCR em Tempo Real (RPT-09B) da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa PDTIS da Fiocruz, usando o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para isso, foram utilizados 5µM de cada cDNA, e a estes adicionados Power Sybr® Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) e 0,25µM de cada oligonucleotídeo, em um volume final de 20µL. Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse além dos genes constitutivos RPL13, RPS13 e HPRT1. As reações foram incubadas no sistema de PCR em tempo real ABI 7000 (Applied Biosystems), seguindo as condições da reação: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final da reação de amplificação, as amostras foram submetidas a uma nova incubação para geração da curva de dissociação, onde se determina o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos oligonucleotídeos de duas sequências alvo.

Todos os oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR (Tabela 3) foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene obtidas no UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.uscs.edu/>), utilizando o software *Primer3 v.0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Para tal, alguns fatores foram controlados: (i) tamanho do iniciador; (ii) tamanho do produto; (iii) temperatura de anelamento dos iniciadores; (iv) conteúdo GC do iniciador; (v) chance de pareamento entre o par de iniciadores e dentro do mesmo iniciador; e (vi) força de anelamento na extremidade 3' do iniciador. Após serem desenhadas, as sequências foram validadas pela ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) utilizando o banco de genes humanos do NCBI.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

Gene	Fita	Sequência (5' - 3')
CD64	Senso	GCC ACA GAG GAT GGA AAT GT
	Anti-senso	CAT GAA ACC AGA CAG GAG TGG
LACTOFERRINA	Senso	GAA TCA TGC CGT GGT GTC T
	Anti-senso	GGG CAG TCA GAT CCA TTT CT
GTPase	Senso	AGG GAG AAG ACC GTG GAA AT
	Anti-senso	GGC ATG TAC GTT GCG GTA GT
PDL-1	Senso	AGG GAG AAT GAT GGA TGT GAA
	Anti-senso	CGT CTC CTC CAA ATG TGT ATC A
CXCL-10	Senso	TTC CTG CAA GCC AAT TTT GT
	Anti-senso	CCT TTC CTT GCT AAC TGC TTT C
OASL	Senso	AAT TTC TGC CCA TCC TTC AG
	Anti-senso	TGG CTT TCA CAT ACT GCT GGT A

### 3.9 Análise dos dados de qRT-PCR

Inicialmente foi realizada uma análise da curva de dissociação (curva de “melting”) no próprio equipamento, com o objetivo de confirmar a amplificação específica através da temperatura de dissociação do produto de amplificação, que produz um único pico.

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das duplicatas da reação de qRT-PCR de cada amostra ( $\Delta R_n$ ), utilizou-se o ajuste de função logística, ou curva sigmóide, de quatro parâmetros para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções qpcR (103), para a linguagem estatística R (104) versão 2.9.22. O ciclo de amplificação, ou  $C_q$ , foi determinado como o ciclo relativo ao ponto de máxima da segunda derivada da curva sigmóide ajustada (ponto característico, ou *crossing point* [Cp]). O uso desse ponto de máxima característico é conveniente uma vez que ele se encontra numa região de eficiência constante na fase exponencial da curva de amplificação, além de ser invariante do poço e placa aonde ocorre a reação de qRT-PCR (105). A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene foi obtida pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene. A média geométrica dos genes RPL13 (ribossomo 60S da proteína L13) e HPRT1 (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1) foram utilizadas para a normalização das amostras amplificadas.

Para comparação das médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foi utilizado o teste one-way ANOVA não paramétrico via permutação irrestrita ( $n=1000$ ), seguida da comparação de médias par-a-par por teste T não paramétrico com correção de Bonferroni (106). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Níveis de significância bicaudais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como altamente significantes, significantes e sugestivos, respectivamente.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 TST não corresponde à resposta *in vitro* a antígenos específicos de *M. tuberculosis*, detectada utilizando IFN- $\gamma$ como biomarcador

A resposta cutânea ao PPD (TST) com diâmetro maior da área de endureção resultante da injeção do antígeno igual ou maior que 5 mm é considerada positiva, e é um critério importante para diagnóstico de infecção latente pelo *M. tuberculosis* (TBL) em indivíduos com mais de 2 anos pós-vacinação com BCG ou não-vacinados. O diagnóstico de TBL é seguido de tratamento profilático da tuberculose com uso prolongado de antibióticos (6 a 9 meses), com custos e riscos potenciais relevantes para o paciente e para o Sistema Único de Saúde no Brasil (8, 13). Como o TST, que é o teste padrão para diagnóstico de TBL no Brasil é um teste que pode ser afetado pela vacinação prévia com BCG, e com capacidade prognóstica limitada, faz-se necessário investigar se a complementação do TST com avaliação de outros parâmetros, ou a sua substituição por um novo teste pode contribuir para uma maior sensibilidade e especificidade na detecção de TBL e TB pulmonar ativa. Inicialmente comparamos as respostas ao TST e níveis de IFN- $\gamma$  induzidos *in vitro* por peptídeos derivados de proteínas específicas do *M. tuberculosis* (Quantiferon TB Gold in tube; QFT TB G IT). Foram avaliados para esta finalidade 36 indivíduos, sendo 15 negativos (14 indivíduos com TST de 0 mm, 1 com 3 mm) para TST e 21 positivos (TST  $\geq$  5 mm; Fig. 5). Conforme mostrado na figura 5, quatro indivíduos tiveram resultados indeterminados no teste *in vitro*. Dois destes indivíduos eram negativos para TST e 2 tinham TST maior que 10 mm (Fig. 5; região 1). Testes deste tipo devem ser repetidos, especialmente quando a causa da indeterminação é a produção de IFN- $\gamma$  pelos controles não-estimulados, pois isto pode ser ocasionado por doenças inflamatórias com manifestações sistêmicas. Na região 2 da Fig. 5 são mostrados indivíduos com TST negativo, mas QFT TB G IT positivo. Este é um grupo potencialmente importante, porque estes indivíduos já foram expostos ao *M. tuberculosis*, mas não seriam detectados através do TST. Um indivíduo com

TST de 3 mm, portanto negativo pelos critérios em uso no Brasil, foi positivo quando avaliado pelo QFT TB G IT.

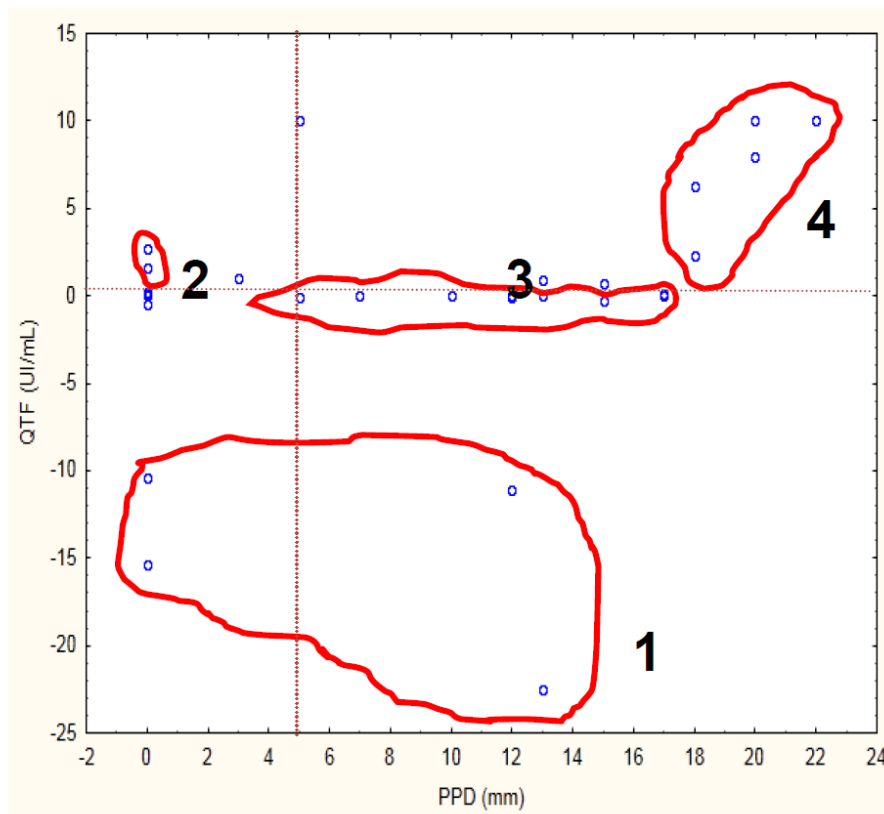


Figura 5: Avaliação do IGRA (QuantiferonTB-Gold in tube) em indivíduos saudáveis positivos e negativos para o TST e em pacientes com tuberculose ativa. IGRA e TST foram realizados em 36 indivíduos residentes na cidade do Rio de Janeiro. As leituras do TST (PPD; eixo dos “x”) estão expressas em mm de diâmetro da área de endureção no local de injeção do antígeno. Os níveis de resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis* (Quantiferon TB-Gold in tube; diferença entre níveis de IFN- $\gamma$  em plasma de tubo estimulado por 24 horas com antígenos de *M. tuberculosis* a 37° C e tubo controle não-estimulado; unidades internacionais de IFN- $\gamma$ , QTF, UI/mL, eixo dos “y”). Pontos incluídos na região 1 correspondem a ensaios IGRA com resultado indeterminado devido à produção de IFN- $\gamma$  elevada no tubo controle não-estimulado; n=4). A região 2 identifica indivíduos com leitura “0” para o TST e com IGRA positivo (n=2). Na região 3 estão indivíduos positivos para o TST e negativos para IGRA (n=9) e na região 4 estão indivíduos com TST > 15 mm e positivos para IGRA. Linhas perpendiculares aos dois eixos separam valores positivos dos negativos para TST (x) e para IGRA (y).

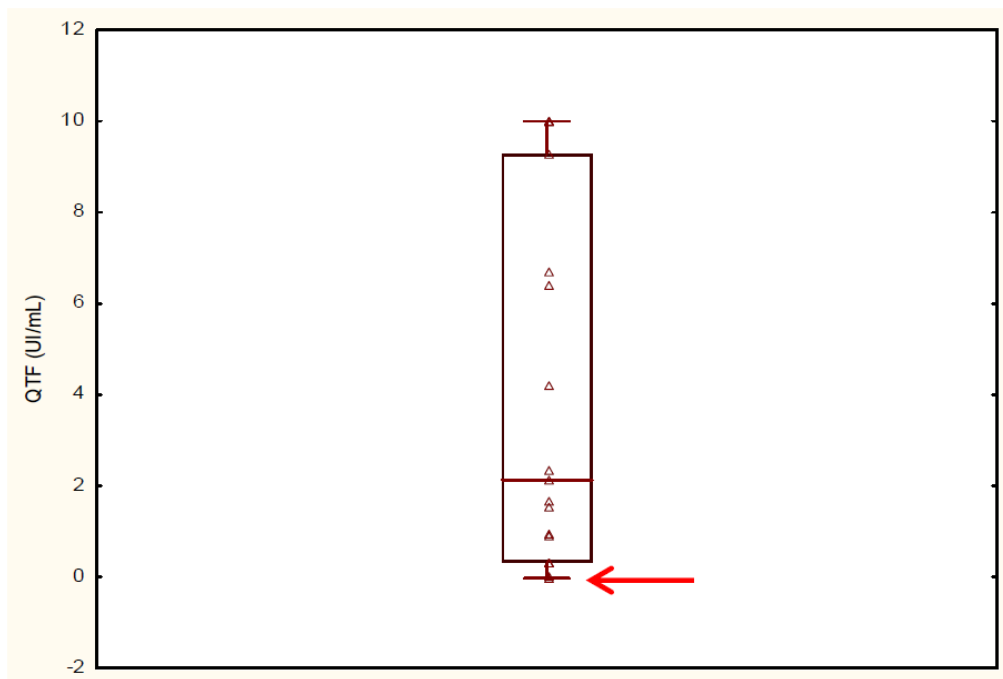


Figura 6: IGRA em indivíduos com tuberculose pulmonar. IGRA foi realizado em 19 pacientes com tuberculose pulmonar virgens de tratamento (73,7% de positividade ao teste). A seta mostra os indivíduos negativos).

O grupo mostrado na região 3 corresponde aos 9 indivíduos positivos para o TST com valores entre 5 e 17 mm, mas com resposta negativa a antígenos específicos de *M. tuberculosis* (QFT TB G IT). Finalmente, na região 4 do gráfico, estão 5 indivíduos com os dois testes positivos e com valores para o TST acima de 15 mm. Todos os indivíduos testados são adultos e a grande maioria daqueles com TST negativo havia sido vacinada pelo menos uma vez com BCG, havendo casos de repetição da vacinação sem viragem do TST (Tabela 2). Inegavelmente os TSTs positivos sem evidência de contato com antígenos específicos de *M. tuberculosis* (Fig. 5, região 3) geram uma interrogação quanto ao uso do TST para comprovar exposição prévia ao *M. tuberculosis*, pois correspondem a 29% dos indivíduos testados simultaneamente com os 2 métodos. Esta discordância entre o TST e os IGRAs já foi descrita anteriormente em outros estudos (61).

A avaliação de pacientes com tuberculose pulmonar virgens de tratamento e sem dados clínicos relacionados à infecção por HIV, detectou positividade para antígenos específicos de *M. tuberculosis* (QFT TB G IT) em 14 de 19 pacientes (73,7 %), o que corresponde a uma sensibilidade na faixa observada em outras populações (Fig. 6; 63). Dos 5 pacientes com tuberculose pulmonar virgem de tratamento que foram negativos para o QFT TB G IT, que avalia níveis de IFN- $\gamma$  como biomarcador para resposta específica aos antígenos *M. tuberculosis*-específicos, 4 foram positivos, quando plasma do mesmo tubo de cultura foi investigado para CXCL-10 (Dados não incluídos). Esta observação é consistente com a heterogeneidade de níveis de IFN- $\gamma$  observados nos pacientes (Fig. 6). Observações adicionais serão efetuadas para avaliar se esta heterogeneidade de resposta está associada a diferenças no perfil da doença nos diferentes pacientes.

#### **4.2 O uso de CXCL10 combinado a IFN- $\gamma$ como alternativa para detecção de tuberculose latente e tuberculose pulmonar ativa**

Como se pode concluir da avaliação do TST e de testes baseados no uso do IFN- $\gamma$  como biomarcador para o diagnóstico de TBL e TB pulmonar ativa, a avaliação de outros biomarcadores para uso isolado ou em combinação com IFN- $\gamma$  em testes diagnósticos para tuberculose é uma necessidade premente. Em revisão do problema, Ruhwald e cols. observaram que mais de 40 biomarcadores já foram investigados para esta finalidade em passado recente, e CXCL10 é o biomarcador com maior potencial para esta finalidade (107).

Para abordar de forma comparativa o uso potencial de CXCL10 para diagnóstico de TBL e tuberculose pulmonar, avaliamos indivíduos negativos para TST (PPD < 5 mm; n = 17), com TST positivo (PPD  $\geq$  5 mm; n = 24) e pacientes com TB pulmonar virgens de tratamento (n = 18). A grande maioria dos indivíduos incluídos nos três grupos foi vacinada com BCG na infância, porém isto não se traduziu em positividade automática dos testes *in vitro*, utilizando IFN- $\gamma$  ou CXCL10 como biomarcadores, ou mesmo do TST.

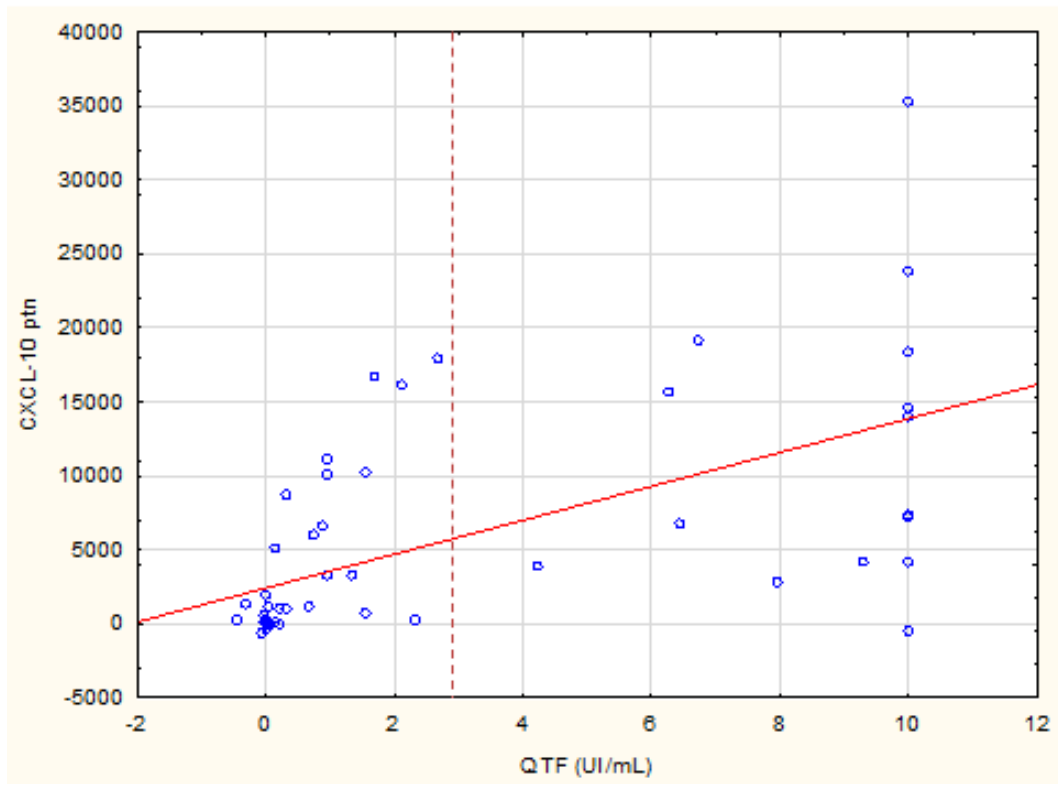
Uma visão geral da correlação entre os níveis de IFN- $\gamma$  e CXCL10 nos três grupos pode ser vista na figura 7A. A análise por regressão linear desta correlação, após a remoção dos indivíduos com testes não-conclusivos (indeterminados) e daqueles com valores de IFN- $\gamma$  maiores que 10 UI/mL no teste QFT TB G IT, mostra uma alta correlação linear positiva entre os níveis de IFN- $\gamma$  e CXCL10 detectados nos três grupos estudados ( $n = 47$ ,  $r = 0,565$ ,  $p < 0,00004$ ; Fig. 7B).

Entre os indivíduos negativos para o TST 58,8% foram também negativos para IFN- $\gamma$  e CXCL10 (10 em 17). Porém, 3 indivíduos em 17 tiveram testes positivos com os dois biomarcadores utilizados e mais 2 foram positivos apenas para CXCL10. Assim, 5 indivíduos com resultados *in vitro* indicativos de exposição ao *M. tuberculosis* seriam considerados não-expostos se o TST isoladamente fosse o critério para definir tuberculose latente (29,4%). No grupo positivo para o TST, 5 indivíduos em 24 foram negativos em resposta a antígenos específicos de *M. tuberculosis* em testes medindo os 2 biomarcadores (20,8%). Houve concordância entre os três testes utilizados em 13 indivíduos (54,16%). Se incluirmos como concordantes com o TST os voluntários positivos para apenas um biomarcador a proporção de concordância sobe para 70,83%.

Já a positividade nas respostas a antígenos específicos de *M. tuberculosis* em pacientes com tuberculose pulmonar virgens de tratamento foi de 61,1% simultaneamente para detecção de IFN- $\gamma$  e CXCL10 (11 em 18). Se considerarmos como positivos os resultados positivos para apenas 1 dos biomarcadores a positividade sobe para 94,4%, deixando apenas 1 paciente em 18 negativos.

Sumarizando os resultados englobando TST, IFN- $\gamma$  e CXCL10 nos grupos avaliados, o TST não detectou uma proporção razoável de indivíduos já expostos ao *M. tuberculosis*. Naqueles com TST positivo, a ausência de resposta a antígenos específicos de *M. tuberculosis* em parte do grupo coloca em evidência falha na especificidade do TST. Finalmente, em todos os grupos, a utilização de mais de um biomarcador levou a importante aumento de sensibilidade na detecção de resposta *M. tuberculosis*-específica.

7A



7B

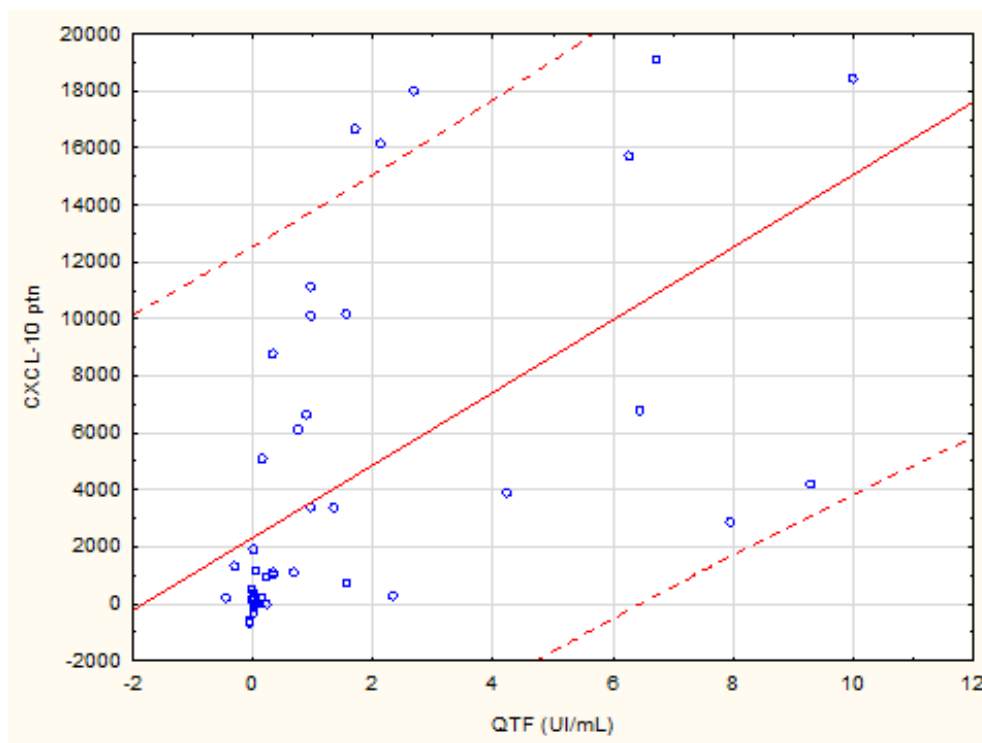


Figura 7: Resposta *M. tuberculosis*-específica em indivíduos saudáveis positivos e negativos para TST e em pacientes com TB pulmonar. Os níveis de CXCL10 em pg/mL estão nos eixos dos “y” e os de IFN- $\gamma$  expressos em unidades internacionais por mL estão nos eixos dos “x”, QTF (UI/mL). A) n= 59; NE= 17, TBL= 24 e TB= 18. Os níveis de IFN e CXCL10 em plasma obtido de sangue não-fracionado cultivado utilizando o kit Quantiferon TB-Gold in tube foram obtidos em ensaios de ELISA descritos nos Materiais e Métodos. B) Após remoção de 7 indivíduos com valores de IFN- $\gamma$  acima do limite máximo de detecção (10 UI/mL), análise por regressão linear da correlação de níveis individuais foi realizada e demonstrada a correlação (linhas tracejadas mostram limites de confiança de 0,95;  $r = 0,565$ ,  $p < 0000,4$ ; Statistica 11, Statsoft).

### 4.3 Níveis de expressão de CD64 em leucócitos sanguíneos em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* e em pacientes com tuberculose pulmonar

Como já foi observado com a utilização de IFN- $\gamma$  e CXCL10 como biomarcadores para detecção de resposta específica a antígenos de *M. tuberculosis*, a utilização de mais de um biomarcador aumentou a sensibilidade na detecção de resposta em indivíduos com tuberculose latente e em pacientes com tuberculose. Desta forma passamos a avaliar outros biomarcadores em termos de detecção de tuberculose latente e doença ativa em nosso grupo de voluntários.

Conforme mencionado anteriormente, CD64 é um marcador importante de manifestações sistêmicas de resposta inflamatória. Levando-se em conta a facilidade de avaliação deste biomarcador em leucócitos sanguíneos por citometria de fluxo, torna-se uma alternativa relevante para investigação em nosso grupo de voluntários.

Avaliamos a expressão de CD64 em leucócitos do sangue. Para isso, utilizamos o kit Leuko64 conforme descrito na metodologia. A escolha deste método foi importante, pois este kit permite a quantificação da expressão de CD64 e CD163 na superfície celular, porque os dados são normalizados com esferas fluorescentes e apresentados na forma de índice. Após a seleção das regiões de monócitos, neutrófilos e leucócitos (Figura 8A), os cálculos dos índices foram realizados com base na intensidade de fluorescência média das células. Conforme indicado na parte superior do gráfico 8B, o índice de CD163 de monócitos não variou entre os indivíduos pertencentes aos diferentes grupos de estudo. Entretanto, a expressão de CD163 em neutrófilos foi significativamente maior no grupo de pacientes com TB ativa (TB), quando comparados aos indivíduos com TB latente e aos controles não-expostos ao *M. tuberculosis* (Figura 8B). A análise da expressão de CD64 em monócitos revelou que não houve diferença significativa entre os grupos, porém a expressão de CD64 em neutrófilos foi significativamente maior no grupo de indivíduos com TB (Figura 8C). Todos os pacientes com TB ativa tiveram índices de expressão de CD64 de neutrófilos maiores que 1,0. Estes resultados



sugerem que a expressão de CD64 pode ser um possível candidato a um biomarcador de evolução para doença ativa da infecção pelo *M. tuberculosis*.

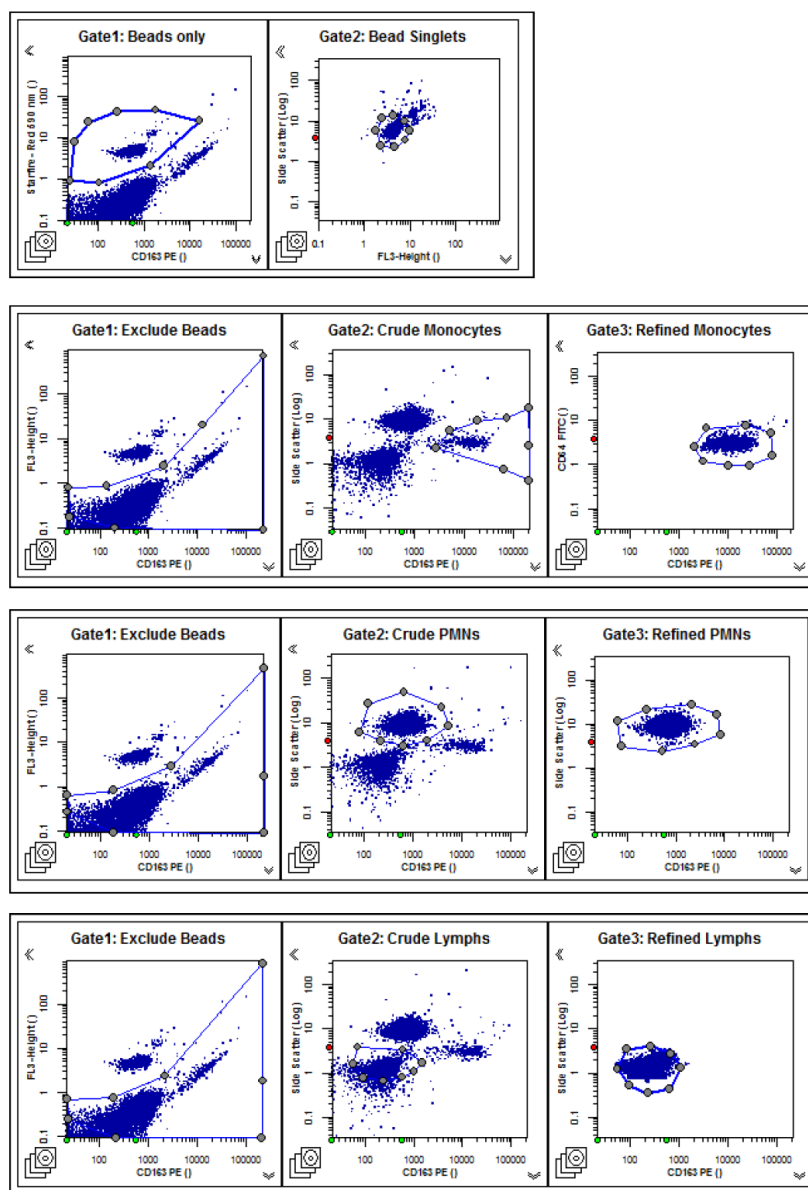


Figura 8A: Dot-plots representativos das regiões selecionadas para análise de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Sangue total de pacientes e doadores saudáveis foram corados com anticorpos anti-CD64 FITC e anti-CD-163 PE para posterior análise de citometria. Após a coloração as células vermelhas foram lisadas com solução de lise contendo cloreto de amônio. Em cada amostra adquirida foi adicionada esferas marcadas com StarFire Red e FITC. O painel A é representativo dos dot-plots utilizados para analisar o padrão das esferas e de monócitos, neutrófilos e linfócitos, respectivamente. O kit leuko64 executa a análise simultânea da expressão de linfócitos (sem expressão, índice de CD64 < 1,0), monócitos (expressão moderada a elevada, CD64 índice > 3,0). Os resultados de neutrófilos (PMN CD64 índice) só é considerado quando o controle negativo (Linf. CD64 índice) e controle positivo (MO CD64 índice) estão dentro da faixa apropriada. O cálculo do PMN CD64 índice é lote-

específico e foi realizado com o programa QuantiCalc (Trillium Diagnostics) da seguinte forma:  $CD64 \text{ índice} = \text{fator de calibração da esfera} \times (\text{mediana da intensidade de fluorescência média de neutrófilos} / \text{mediada da intensidade de fluorescência média das esferas})$ .

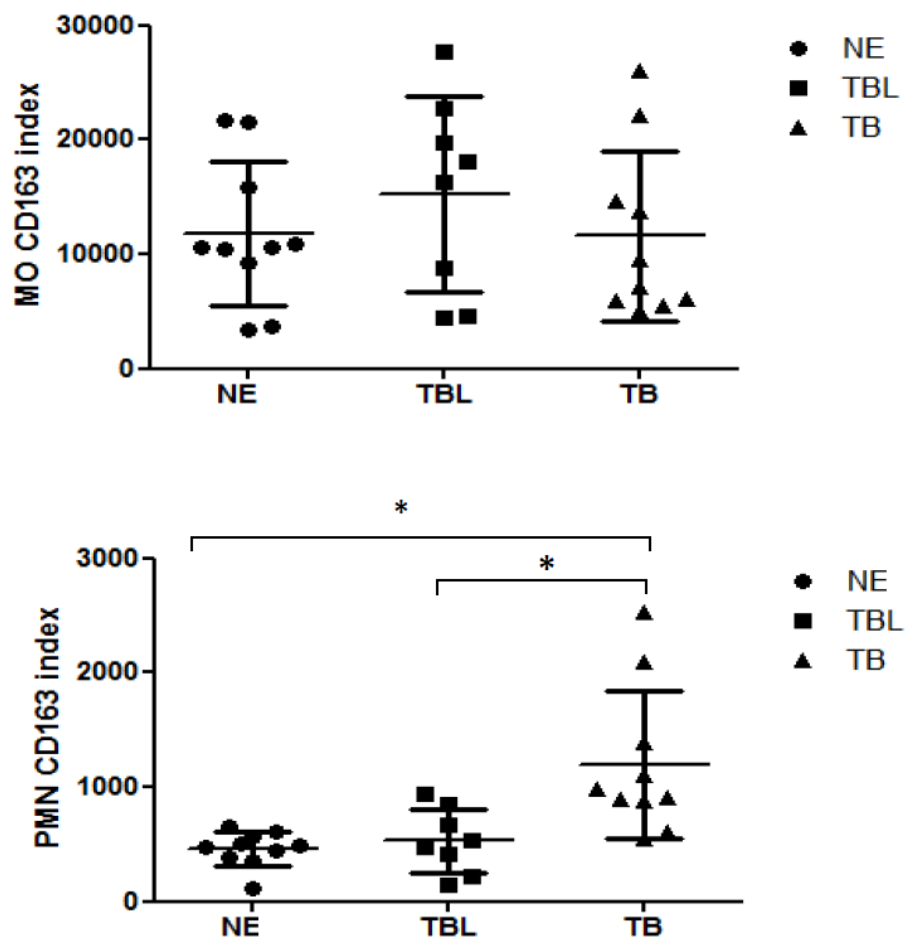


Figura 8B: CD163 índice para monócitos e neutrófilos do sangue total dos doadores saudáveis (NE; N= 10), indivíduos TB latentes (TBL, N= 8) e pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB, N= 10). O gráfico representa os valores individuais e as médias  $\pm$  desvio padrão de cada grupo. \* representa as diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e post test de Bonferroni, P < 0,05).

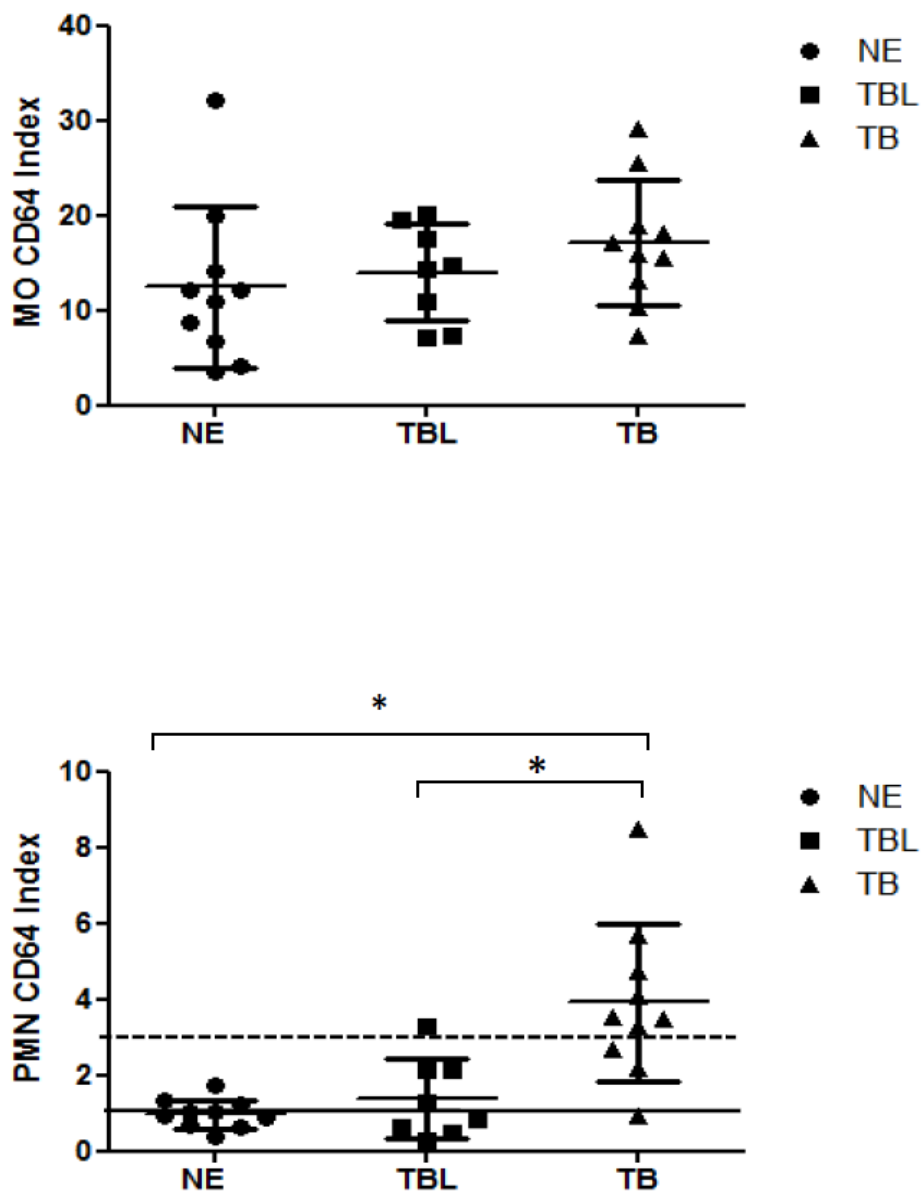


Figura 8C: CD64 índice para monócitos e neutrófilos do sangue total dos doadores saudáveis (NE; N= 10), indivíduos com TB latente (TBL, N= 8) e pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB, N= 10). O gráfico representa os valores individuais e as médias  $\pm$  desvio padrão de cada grupo. \* representa as diferenças significativas entre os grupos (ANOVA e post test de Bonferroni,  $P < 0,05$ ). Índice de CD64 menor que 1,0 é considerado saudável e valores maiores que 3,0 representam respostas inflamatórias agudas sistêmicas.

#### 4.4 Expressão gênica de moléculas-alvo em leucócitos sanguíneos

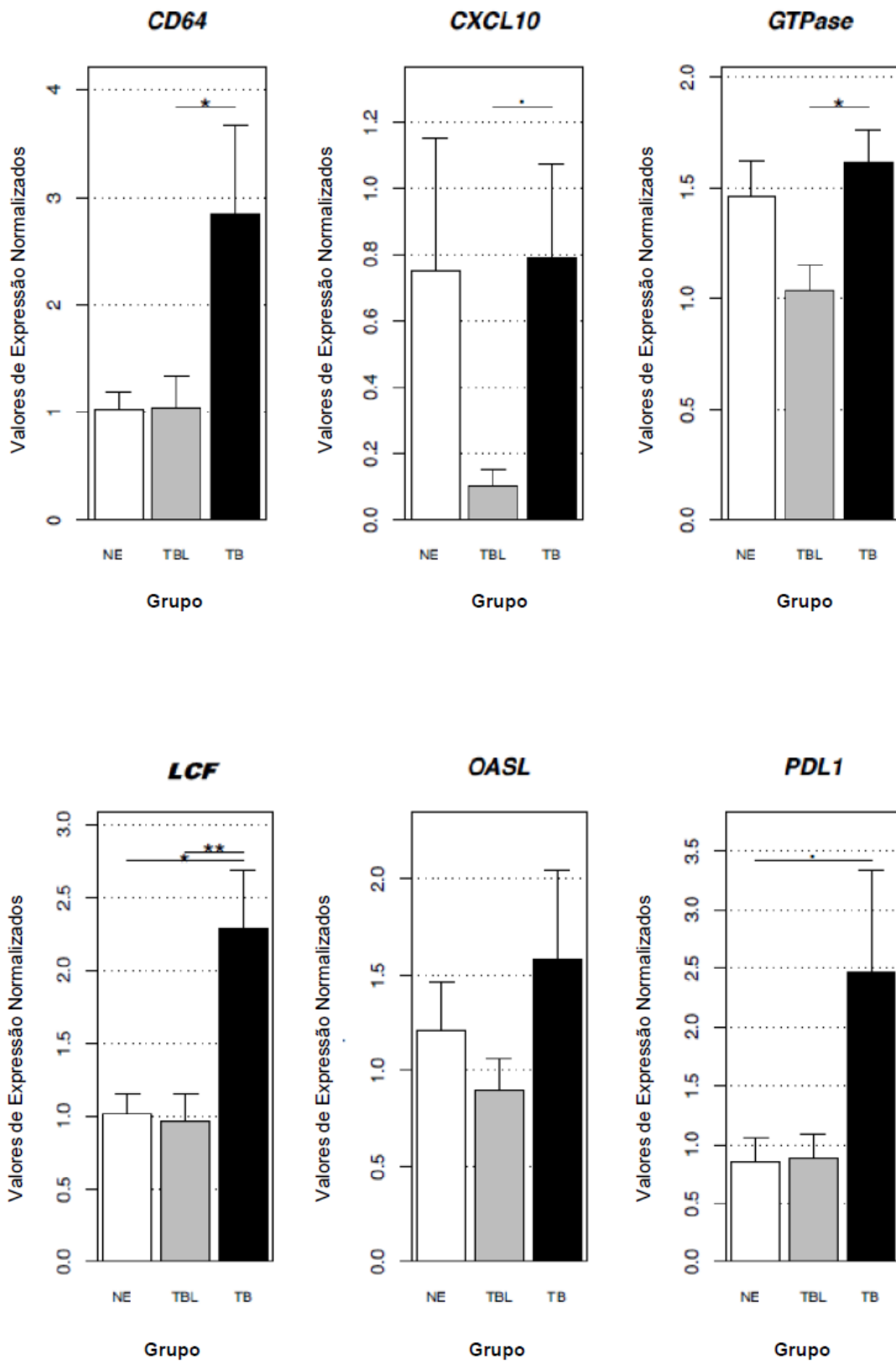
Jacobsen e cols. realizaram um trabalho que partiu de 8033 genes, cuja expressão foi analisada em indivíduos não-expostos ao *M. tuberculosis* (TST < 5 mm), expostos repetidamente por contato domiciliar ou profissional com pacientes com tuberculose e TST >10 mm, e pacientes com tuberculose (76). Os autores inicialmente observaram a expressão destes genes em um grupo de pacientes em comparação com indivíduos saudáveis infectados. Os genes selecionados nesta etapa com o uso de microarranjos para avaliar a expressão diferencial. Dois genes foram selecionados por expressão diferencial em monócitos de pacientes em comparação com indivíduos com TB latente (CD64 e FPR1). Finalmente foi aplicada análise linear discriminante para identificar o número mínimo de genes necessário para discriminar indivíduos infectados, mas saudáveis e pacientes com tuberculose em células mononucleares de sangue periférico. Os autores identificaram a expressão de três genes CD64, lactoferrina e GTPase 33A associada Ras como o grupo mínimo para diferenciação de indivíduos saudáveis infectados de pacientes com tuberculose. Estes três genes foram assim incluídos em nossa avaliação de voluntários não-expostos, expostos e com tuberculose.

Berry e colaboradores avançaram um passo em relação aos trabalhos como o de Jacobsen e cols., pois utilizaram RNA de sangue não-fracionado para análise, e ao invés de selecionarem um grupo de genes inicialmente, avaliaram todos os genes sendo expressos, o que evitou a exclusão de genes candidatos menos óbvios ou de subpopulações leucocitárias como os neutrófilos. Estes autores demonstraram a expressão diferencial de genes indutíveis por IFN do tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) especialmente em neutrófilos em pacientes com tuberculose, utilizando algoritmos que permitem identificar expressão gênica associada a ativação de vias específicas de resposta imune e inflamatória. Dois dos genes selecionados dispunham de metodologia que permite analisar simultaneamente os níveis das proteínas codificadas, PDL-1 e CXCL10, que por este motivo foram também incluídos em nosso grupo de genes a serem analisados (108). Finalmente, OASL um gene induzido

fortemente por IFN durante infecções completou nosso grupo de genes a serem testados (89).

Mudanças de expressão de genes em leucócitos sanguíneos geralmente estão associadas a impacto sistêmico da resposta imune *in vivo* durante processos infecciosos. Não foram observadas diferenças significativas em níveis de expressão gênica entre indivíduos não-expostos e com tuberculose latente, utilizando o TST para separar estes dois grupos. Porém, os indivíduos com TBL mostravam diferenças significativas em níveis de expressão gênica para CD64, lactoferrina e GTPase, conforme descrito anteriormente por Jacobsen (76; Fig. 9A). A utilização simultânea dos níveis de mensagem das três moléculas permite segregar em uma mesma região os pacientes com tuberculose ativa, porém alguns indivíduos não-expostos e com TB latente se localizam na mesma região dos pacientes (Fig. 9B). Uma razão importante para que a discriminação entre os grupos não seja melhor é a heterogeneidade intragrupo. Quando avaliamos os níveis de expressão gênica dos três grupos mostrando a distribuição de valores individuais para cada gene, fica clara a dispersão de valores, mesmo para genes com variações significativas intergrupo, o que dificulta a diferenciação dos grupos (Fig. 10). Uma investigação posterior de indivíduos com valores extremos em relação aos seus grupos pode sugerir mudanças na classificação daquele indivíduo, ou alguma característica não compartilhada com os demais membros daquele grupo. Uma aplicação potencial avaliação de níveis de expressão de genes relevantes seria para exclusão de pacientes suspeitos de tuberculose, uma vez que todos os pacientes mostravam expressão modificada em relação aos controles de 5 dos 6 genes avaliados.

9A



9B

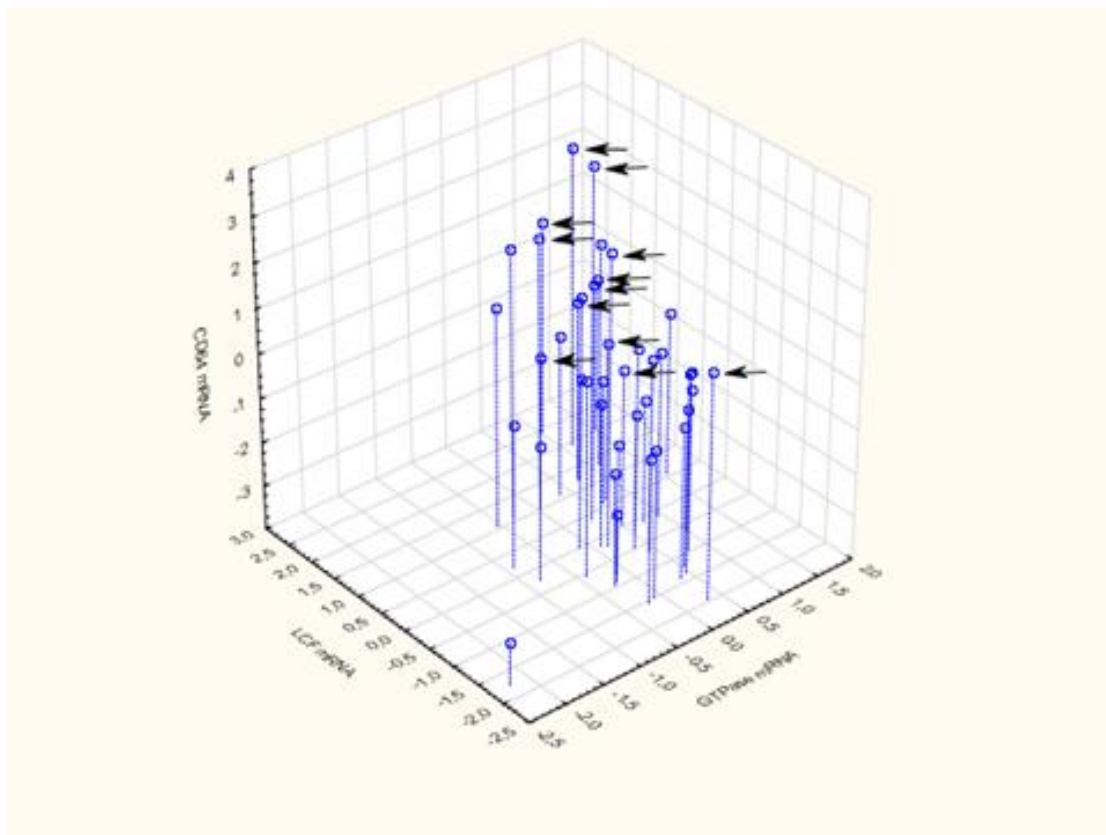


Figura 9: A) Níveis de expressão gênica, em valores relativos, das moléculas CD64, GTPase 33A associada a RAS, Lactoferrina, CXCL10, PDL-1 e OASL nos 16 indivíduos saudáveis, 16 com TB latente e em 16 pacientes TB pulmonar. Os níveis dos mRNAs específicos para as seis proteínas foram normalizados em relação a média de RPL13 (ribossomo 60S da proteína L13) e HPRT1 (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1), moléculas expressas constitutivamente pelas células. O mRNA das células mononucleares foi reversamente transcrito, amplificado e avaliado por RT-PCR quantitativo em unidade de PCR em tempo real Applied Biosystems 7000. Os grupos de estudo são: controles saudáveis não-expostos (em branco), indivíduos com tuberculose latente (em cinza) e pacientes com tuberculose pulmonar (em preto). B) Análise simultânea da expressão de CD64 (CD64 RNA), GTPase associada a Ras(GTPase RNA) e lactoferrina (LCF RNA). Os logaritmos de base 2 dos níveis relativos de RNA em relação ao grupo de genes constitutivos são os valores utilizados para expressão gênica. As setas mostram os indivíduos com tuberculose pulmonar virgens de tratamento (n= 40; NE= 14, TBL= 14, TB= 12)

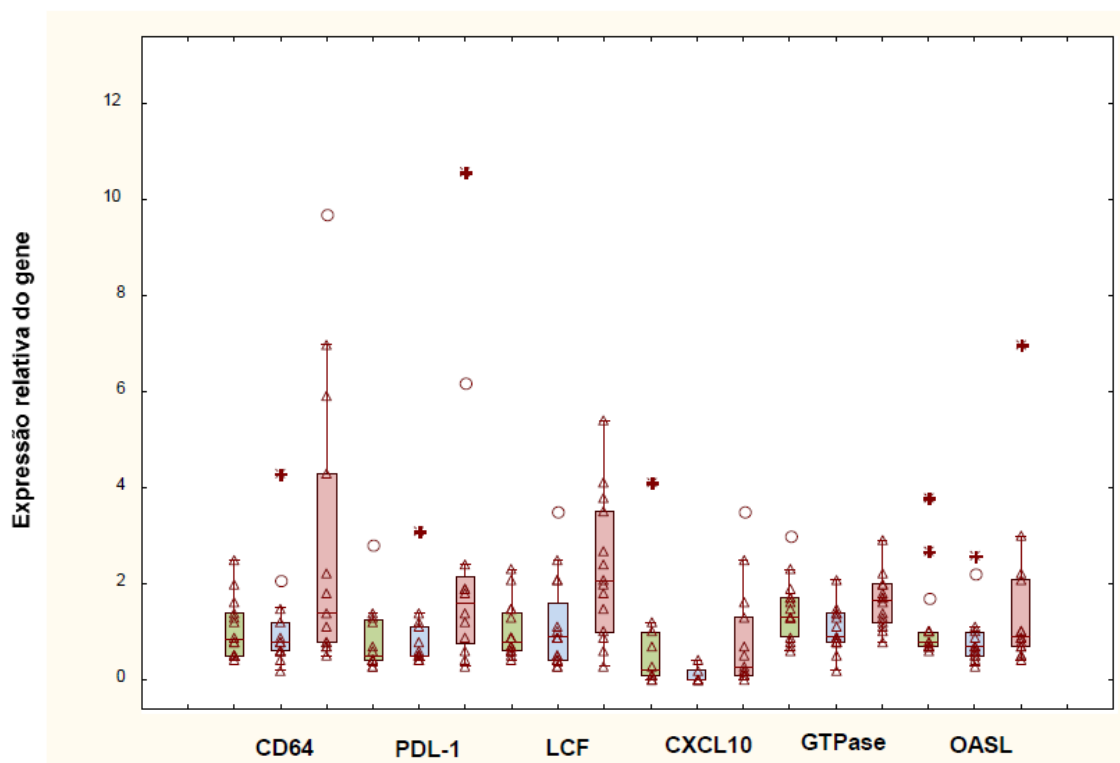


Figura 10: Box-plot representativo da heterogeneidade dos três grupos do estudo em relação às expressões relativas dos seis genes-alvos analisados. Os grupos são: doadores saudáveis não-expostos (em verde), indivíduos com tuberculose latente (em azul) e pacientes com tuberculose pulmonar (em rosa). Simbologia: as três "boxes" (verde, azul e rosa) representam o percentual de 25% a 75% da quantidade dos indivíduos em cada grupo, com os indivíduos dispostos em ordem crescente para cada valor de parâmetro avaliado; cada "box" possui um traço representando sua mediana; os círculos representam os indivíduos que estão fora da faixa do grupo (1,5 vezes a diferença entre o valor superior e o inferior de cada "box"); os triângulos representam os indivíduos que estão dentro da faixa do grupo; os círculos estão representando indivíduos que estão fora dos valores-limite para o grupo e os asteriscos representam os valores extremos, que estão fora dos limites delimitados por linhas partindo dos limites das "boxes" e com magnitudes pelo acima ou abaixo de 3 vezes a diferença entre os limites superior e inferior de cada box.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Diagnóstico de infecção latente por *M. tuberculosis* e de tuberculose pulmonar com TST, IFN- $\gamma$ e CXCL10

Se aceitamos a estimativa de 1/3 da população mundial estar infectada pelo *M. tuberculosis*, e uma estimativa anual mundial de 6,2 milhões de casos novos de tuberculose, teremos uma proporção aproximada de 0,27% dos indivíduos com tuberculose latente evoluindo para doença a cada ano (10). Assim, levando em conta apenas estes valores, a amostra de indivíduos com tuberculose latente mínima para inclusão de um indivíduo que evoluirá para doença é de 371 indivíduos com tuberculose latente. A estimativa acima nos permite perceber uma das dificuldades em desenvolver um teste para diagnóstico de tuberculose latente, que forneça também prognóstico de evolução para doença ativa.

O uso obrigatório da vacinação por BCG e o fato de que o Brasil é um país endêmico para hanseníase adicionam duas outras fontes importantes de infecção micobacteriana, com potencial para gerar resultados positivos em um teste com antígenos micobacterianos como o TST, no qual a preparação antigênica, a tuberculina, não é constituída de antígenos específicos do *M. tuberculosis*. Indivíduos previamente vacinados com BCG, a grande maioria da população atualmente, ou expostos à infecção com *Mycobacterium leprae* (todos os estados do Brasil com exceção do Rio Grande do Sul) podem assim ter um TST positivo sem necessariamente terem sido infectados com *M. tuberculosis*.

As observações acima nos permitiam esperar por uma certa proporção de TSTs positivos sem resposta patógeno-específica, que nos permitisse concluir pela exposição daqueles indivíduos ao *M. tuberculosis*. Nossos resultados comprovaram esta hipótese, pois 29% dos indivíduos com TST positivo tiveram IGRA negativo (Fig. 5, região 3). Esta é uma proporção muito elevada para falsos positivos. Trata-se de um aspecto importante e que merece ser investigado de forma mais detalhada, pois se todos os indivíduos com

tuberculose latente receberem quimioprofilaxia, certamente uma redução de aproximadamente 1/3 no número dos que teriam indicação de quimioprofilaxia, seria uma redução importante de custos, e se levarmos em conta a hepatotoxicidade dos antibióticos utilizados, redução de riscos também para os pacientes.

Um grupo que pode ser de grande interesse para avaliação de potencial prognóstico para testes diagnósticos para tuberculose é o grupo de indivíduos com TST > 15 mm e IGRA positivo com altos níveis de produção de IFN- $\gamma$  (Fig. 5, região 4). Este grupo corresponde aos critérios para diagnóstico de TBL em indivíduos previamente vacinados com BCG na Inglaterra. Berry e colaboradores selecionaram indivíduos com este perfil para o grupo de TBL em trabalho que detectou alguns voluntários com TBL e perfil de expressão gênica em leucócitos sanguíneos semelhante ao de pacientes com TB pulmonar, o que sugere que este critério de seleção pode ser relevante para detectar indivíduos em fase precoce de transição de infecção latente para doença ativa (108). Uma possibilidade interessante é a de se avaliar este grupo utilizando tomografia computadorizada de alta resolução, um método com maior sensibilidade do que as radiografias comuns, para se investigar a presença de lesões iniciais de TB pulmonar neste grupo (Vide Introdução; 1.5.2 Diagnóstico radiológico; 52).

A grande maioria de nossos voluntários não-expostos à infecção *por M. tuberculosis* (TST negativo) foi vacinada com BCG na infância, o que sugere que pelo menos após um certo tempo esta vacina não interfere com o TST ou com os IGRAs.

Um outro aspecto importante que merece uma investigação mais detalhada no futuro é o grupo de indivíduos negativos para o TST, que foi positivo para IGRA quando se usou IFN- $\gamma$  ou CXCL10 como biomarcador. Um total de 29,4% dos que foram considerados não-expostos ao *M. tuberculosis* utilizando o TST, seriam considerados expostos pela detecção de resposta patógeno-específica *in vitro* (Fig. 5, Região 2).

A utilização do IGRA em pacientes com tuberculose não-tratados mostrou resultados positivos em 73,7% dos pacientes com o uso isolado de IFN- $\gamma$  como biomarcador (Fig. 6), e uma elevação para 94,7% de testes positivos, quando positividade para CXCL10 também foi considerada nos que

foram negativos para IFN- $\gamma$ . O uso combinado de IFN- $\gamma$  e CXCL10 como biomarcadores aumentou a sensibilidade para detecção de exposição ao *M. tuberculosis*, no grupo geralmente utilizado para controle positivo na avaliação de testes para exposição/infecção por *M. tuberculosis*, os pacientes com tuberculose pulmonar.

Houve uma correlação significativa e direta entre os níveis de IFN- $\gamma$  e CXCL10 induzidos por antígenos específicos de *M. tuberculosis* (Fig. 7). Tendo em vista o perfil Th1 da resposta ao *M. tuberculosis* e o fato de IFN- $\gamma$  ser uma das citocinas indutoras de produção de CXCL10 esta observação era esperada. Porém, outros mediadores também induzem a produção de CXCL10, e respostas positivas para os antígenos do patógeno foram observadas em indivíduos saudáveis e pacientes com tuberculose sem produção de IFN- $\gamma$  detectável. Nos indivíduos saudáveis sempre que não havia concordância entre os níveis de IFN- $\gamma$  e CXCL10, o teste era negativo para IFN- $\gamma$  e positivo para CXCL10. Porém, entre os pacientes com tuberculose pulmonar ocorreram as duas alternativas (n=18; 11 pacientes com resultados concordantes, 4 com positividade apenas para CXCL10 e 2 com positividade apenas para IFN- $\gamma$ ). Neste ponto não está claro se estes diferentes perfis de resposta são apenas oscilações funcionais dos leucócitos sanguíneos de voluntários expostos ao *M. tuberculosis*, ou se representam diferentes padrões de resposta imune a esta micobactéria.

## **5.2 Expressão dos receptores imunomoduladores CD64 e CD163 em TBL e tuberculose pulmonar**

A inclusão de um número maior de biomarcadores para diagnóstico tanto de tuberculose latente quanto de doença ativa são necessidades prementes. No caso da TBL, conforme observamos em nossos resultados houve casos não detectados pelo TST que foram positivos quando IFN- $\gamma$  e CXCL10 foram utilizados como biomarcadores. Além disto, aproximadamente 1/3 dos indivíduos positivos para o TST não era comprovadamente exposto ao *M. tuberculosis*, uma vez que não produziram IFN- $\gamma$  ou CXCL10 em resposta a

antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Um aspecto adicional a ser levado em conta, é a proporção importante dos pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar, nos quais não se chega a um diagnóstico conclusivo por falta de elementos para isto (8).

Trabalhos anteriores descreveram alterações nos níveis de expressão de CD64 e CD163 em monócitos sanguíneos de pacientes com tuberculose, em comparação com voluntários saudáveis (83). Porém, nossos resultados não confirmaram este aumento de expressão para as duas moléculas em monócitos após a evolução da infecção micobacteriana para doença ativa (Figs. 8B e 8C).

Quando foi analisada a expressão de CD64 e CD163 em neutrófilos não houve diferença de nível de expressão quando indivíduos negativos e positivos para TST foram comparados. Porém, houve um aumento claro no nível de expressão destas moléculas em neutrófilos de pacientes com tuberculose.

Tendo em vista a diversidade genética de populações de diferentes regiões, com impacto na resposta imune, inflamatória e conseqüentemente interação patógeno-hospedeiro, uma origem potencial para diferenças de características observadas e evolução em doenças infecciosas está na variação genética dos hospedeiros humanos. Por outro lado, a existência de um grande número de cepas de *M. tuberculosis* adiciona um segundo elemento gerador de variação infecção humana pelo *M. tuberculosis*. Outros aspectos como vacinação pelo BCG e exposição à micobactérias ambientais também podem ser fontes de alteração na resposta do hospedeiro às infecções micobacterianas.

Outro ponto a ser esclarecido neste aumento de expressão de CD64 e CD163 é o significado desta modificação funcional do neutrófilo na evolução da infecção. CD64 tem sua expressão aumentada em diversas infecções bacterianas agudas, sendo inclusive utilizado para diagnóstico precoce de sepse. Como já existe o teste diagnóstico comercial baseado na expressão de CD64 em neutrófilos para esta finalidade, caso se conclua pela relevância de avaliação da expressão desta molécula no acompanhamento de pacientes com TB, o teste estaria disponível imediatamente para uso clínico. Com relação a CD163 existem dados em pacientes com tuberculose de Guiné-Bissau, na

África, que correlacionam aumento de nível de CD163 solúvel no sangue com maior probabilidade de morte do paciente, mesmo em tratamento (109).

O CD163 é um receptor com função de “scavenger”, e geralmente associado à modulação negativa de resposta imune e inflamatória. Seria importante esclarecer na tuberculose, se o aumento de expressão desta molécula em neutrófilos modula negativamente a resposta efetora contra o *M. tuberculosis*, contribuindo para a evolução da infecção latente para doença ativa, ou seria uma etapa secundária de regulação negativa da resposta inflamatória, elevando-se proporcionalmente à extensão das lesões.

### **5.3 Alterações de expressão gênica em leucócitos sanguíneos na tuberculose pulmonar**

Os trabalhos de Jacobsen, Berry e mais recentemente Cliff permitem uma visão da regulação de expressão gênica na infecção pelo *M. tuberculosis*, iniciando-se na fase de TBL e seguindo-se até o tratamento e cura desta doença com resolução das lesões inflamatórias pulmonares (76, 108, 110).

Nossos resultados mostraram aumento de expressão para mensagens específicas de CD64, GTPase associada a Ras, e lactoferrina, os três genes considerados como o conjunto mínimo para diferenciação entre doença pulmonar ativa e indivíduos saudáveis expostos (TST positivo) por Jacobsen (76). Com relação aos resultados de Jacobsen, houve discordância nas observações referentes aos níveis de mensagem para GTPase, que no trabalho anterior se reduzia na tuberculose ativa, mas em nosso grupo de voluntários se observa aumento do nível de mensagem quando TBL é comparada com TB pulmonar (Fig. 9A). Além disto, observamos resultados sugestivos de aumento de expressão em TB, quando os mesmos grupos foram comparados, para os genes que codificam PDL-1 e CXCL10, observações que concordam com resultados anteriores de Berry no Reino Unido e na África do Sul (108).

Não encontramos diferenças relevantes entre indivíduos não expostos e expostos à infecção pelo *M. tuberculosis*, quando utilizamos o TST como

parâmetro para diferenciação destes 2 grupos. Talvez a combinação do TST com IGRA, e eventualmente com expressão de mensagens específicas e/ou marcadores por leucócitos sanguíneos possam permitir uma melhor separação entre indivíduos expostos e não expostos à infecção com *M. tuberculosis*. Porém, não podemos atualmente excluir a possibilidade de que não haja realmente diferenças entre estes dois grupos. Assim, talvez pelo menos alguns indivíduos classificados como tendo tuberculose latente, mas com padrões de expressão gênica ou produção de mediadores inflamatórios semelhantes a pacientes com doença ativa, sejam pacientes em fase precoce de doença ativa. Como a tomografia computadorizada de alta resolução permite detectar lesões, mesmo em indivíduos com radiografia comum sem alterações pulmonares, seria interessante combinar estas observações de mudanças em biomarcadores com alterações em TCAR, em um esforço para um diagnóstico mais precoce da tuberculose pulmonar.

Outro campo promissor para utilização de níveis de expressão gênica é no acompanhamento do tratamento de tuberculose pulmonar. Tratamentos mais longos reduzem o risco de surgimento de cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*, mas por outro lado expõem o paciente aos efeitos colaterais dos antibióticos utilizados, principalmente hepatotoxicidade. Assim, parâmetros que permitam estabelecer com mais precisão o diagnóstico precoce e a cura serão contribuições relevantes para o controle da tuberculose.

## REFERÊNCIAS

1. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):252-68. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00984.x. Review. PubMed PMID: 21349098; PubMed Central PMCID: PMC3174472.
2. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol.*2012;7:353-84. Epub 2011 Oct 31. PubMed PMID: 22054143.
3. Syed Ahamed Kabeer B, Paramasivam P, Raja A. Interferon gamma and interferon gamma inducible protein-10 in detecting tuberculosis infection. *J Infect.* 2012 Jun;64(6):573-9. Epub 2012 Feb 27. PubMed PMID: 22381458; PubMed Central PMCID:PMC3350596.
4. Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus,1882. *Thorax.* 1982 Apr;37(4):246-51. PubMed PMID: 6180494; PubMed Central PMCID: PMC459292.
5. Ligon BL. Robert Koch: Nobel laureate and controversial figure in tuberculin research. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002 Oct;13(4):289-99. PubMed PMID: 12491235.
6. Robbins & Cotran. *Patologia: bases patológicas das doenças (tradução).* 8ª ed. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editores. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2010.
7. Paim AC. Diagrama representativo da parede celular da espécie *Mycobacterium sp.* [acesso em 2012 Mar 07]. Disponível em: [http://www.google.com.br/imgres?q=parede+celular+Mycobacterium+setimo+cientista&um=1&hl=pt-BR&rlz=1R2ADFA\\_pt-BRBR385&biw=1366&bih=578&tbnid=MbxC90GnmZKqfM:&imgrefurl=http://setimocientista.blogspot.com/2011/03/caracteristicas-dos-organismos-do-reino.html&docid=W-PE5yFR2ApnXM&imgurl=http://1.bp.blogspot.com/-r0vWWhwKI5I/T3B1oSxI7aI/AAAAAAAAABGk/BiOtPOZTJCo/s1600/parede%252Bcelular%252Bde%252Buma%252Bbacteria%252BMycobacterum%252Bsp.JPG&w=973&h=475&ei=X-EfUle5BefW0QGq94G4Aw&zoom=1](http://www.google.com.br/imgres?q=parede+celular+Mycobacterium+setimo+cientista&um=1&hl=pt-BR&rlz=1R2ADFA_pt-BRBR385&biw=1366&bih=578&tbnid=MbxC90GnmZKqfM:&imgrefurl=http://setimocientista.blogspot.com/2011/03/caracteristicas-dos-organismos-do-reino.html&docid=W-PE5yFR2ApnXM&imgurl=http://1.bp.blogspot.com/-r0vWWhwKI5I/T3B1oSxI7aI/AAAAAAAAABGk/BiOtPOZTJCo/s1600/parede%252Bcelular%252Bde%252Buma%252Bbacteria%252BMycobacterum%252Bsp.JPG&w=973&h=475&ei=X-EfUle5BefW0QGq94G4Aw&zoom=1)
8. Schaaf HS, Zumla A., editores. *Tuberculosis: a comprehensive clinical reference.* Kent (UK). Elsevier; 2009.
9. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete

genome sequence. *Nature*. 1998 Jun 11;393(6685):537-44. Erratum in: *Nature* 1998 Nov 12;396(6707):190. PubMed PMID: 9634230.

10. Organização Mundial de Saúde. Electronic recording and reporting for tuberculosis care and control. [acesso em 2012 Mar 30]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564465\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564465_eng.pdf)

11. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação da tuberculose no Brasil, 2012. Taxa de incidência de tuberculose por UF - Brasil 2011(gráfico). [acesso em 2012 Abr 14]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao\\_dia\\_mundial\\_tb\\_26\\_03\\_12.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dia_mundial_tb_26_03_12.pdf)

12. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico, nº 1- 2012. Tuberculose no Brasil: realidade e perspectivas. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. [acesso em 2012 Ago 01]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/6406/783/boletim-1/2012- -tuberculose-no-brasil.html>

13. Kritski AL, Conde MB, Souza GRM. Tuberculose do ambulatório à enfermaria. 3ª Ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2005.

14. Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Nov;39(11):1387-97. Review. PubMed PMID: 17146551.

15. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):20-30. Review. PubMed PMID: 11905811.

16. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:814-943. Epub 2010 Dec 27. Review. PubMed PMID: 21234341; PubMed Central PMCID: PMC3017943.

17. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol*. 1998 Feb 1;160(3):1290-6. PubMed PMID: 9570546.

18. Fenhalls G, Stevens L, Bezuidenhout J, Amphlett GE, Duncan K, Bardin P, Lukey PT. Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Immunology*. 2002 Mar;105(3):325-35. PubMed PMID: 11918694; PubMed Central PMCID: PMC1782672.

19. Herrera MT, Torres M, Nevels D, Perez-Redondo CN, Ellner JJ, Sada E, Schwander SK. Compartmentalized bronchoalveolar IFN-gamma and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Jan;89(1):38-47. Epub 2008 Oct 9. PubMed PMID: 18848499; PubMed Central PMCID: PMC2653281.



20. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, Musella RM, Beigier-Bompadre M, Saab MA, Alves L, Abbate E, de la Barrera SS, Sasiain MC. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6852-60. PubMed PMID: 16272343.
21. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Sep;19(3):513-21. PubMed PMID: 9730880.
22. Blomgran R, Ernst JD. Lung neutrophils facilitate activation of naïve antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2011 Jun 15;186(12):7110-9. Epub 2011 May 9. PubMed PMID: 21555529; PubMed Central PMCID: PMC3376160.
23. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):1-14. Review. PubMed PMID: 15585605.
24. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2007 Feb-Mar;85(2):103-11. Epub 2007 Jan 9. Review. PubMed PMID: 17213830.
25. Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol*. 2002 Mar-Apr;216(1-2):65-72. PubMed PMID: 12381351.
26. Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, Tufariello J, Flynn J, Chan J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol*. 2006 Feb;8(2):218-32. PubMed PMID: 16441433.
27. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):369-77. Epub 2007 Mar 11. PubMed PMID: 17351619.
28. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*. 2010 Apr 15;184(8):4414-22. Epub 2010 Mar 8. PubMed PMID: 20212094.
29. Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2003 Feb;5(2):151-8. Review. PubMed PMID: 12650773.

30. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. 2009 Apr;37(2):80-6. Epub 2009 Mar 23. Review. PubMed PMID: 19308318.
31. Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):294-309. Review. PubMed PMID: 11932234; PubMed Central PMCID: PMC118070.
32. Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today*. 1998 Nov;19(11):491-4. Review. PubMed PMID: 9818540.
33. Van de Berg PJ, van Leeuwen EM, ten Berge IJ, van Lier R. Cytotoxic human CD4(+) T cells. *Curr Opin Immunol*. 2008 Jun;20(3):339-43. Epub 2008 Apr 24. Review. PubMed PMID: 18440213.
34. Woodworth JS, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(4):317-52. Review. PubMed PMID:17073557; PubMed Central PMCID: PMC3134450.
35. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998 Oct 2;282(5386):121-5. PubMed PMID: 9756476.
36. Stegelmann F, Bastian M, Swoboda K, Bhat R, Kiessler V, Krensky AM, Roellinghoff M, Modlin RL, Stenger S. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7474-83. PubMed PMID: 16301655.
37. Peña SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol*. 1997 Apr;9(2):117-25. Review. PubMed PMID: 9194222.
38. Bastian M, Braun T, Bruns H, Rölinghoff M, Stenger S. Mycobacterial lipopeptides elicit CD4+ CTLs in *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3436-46. PubMed PMID: 18292570.
39. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Rollinghoff M, Nunes Sarno E, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):174-9. PubMed PMID: 11175847.
40. Rosat JP, Grant EP, Beckman EM, Dascher CC, Sieling PA, Frederique D, Modlin RL, Porcelli SA, Furlong ST, Brenner MB. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):366-71. PubMed PMID: 9886408.

41. Gansert JL, Kiessler V, Engele M, Wittke F, Röllinghoff M, Krensky AM, Porcelli SA, Modlin RL, Stenger S. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3154-61. PubMed PMID:12626573.
42. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Bonneville M, Peyrat MA, Sireci G, Salerno A. Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2000 May;30(5):1512-9. PubMed PMID: 10820400.
43. Peña SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol.* 1997 Mar 15;158(6):2680-8. PubMed PMID: 9058801.
44. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5243-8. PubMed PMID: 15843520.
45. Huang LP, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice. *J Immunol.* 2007 Jan 1;178(1):77-84. PubMed PMID:17182542; PubMed Central PMCID: PMC2664664.
46. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest.* 2009 May;119(5):1167-77. doi: 10.1172/JCI38482. Epub 2009 Apr 20. PubMed PMID:19381021; PubMed Central PMCID: PMC2673881.
47. Desvignes L, Wolf AJ, Ernst JD. Dynamic roles of type I and type II IFNs in early infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2012 Jun 15;188(12):6205-15. Epub 2012 May 7. PubMed PMID: 22566567; PubMed Central PMCID:PMC3370955.
48. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 2002 May;10(5):221-6. PubMed PMID: 11973155.
49. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5243-8. PubMed PMID: 9144222; PubMed Central PMCID: PMC24663.
50. Cooper AM, Pearl JE, Brooks JV, Ehlers S, Orme IM. Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of *Mycobacterium tuberculosis* in the murine lung. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6879-82. PubMed PMID: 11083808; PubMed Central PMCID: PMC97793.

51. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2243-7. PubMed PMID: 8245795; PubMed Central PMCID: PMC2191280.
52. Capone D. Doenças pulmonares: diagnóstico clínico. In: TARANTINO. (Org.). Guanabara Koogan. 1997. [acesso em 2012 Fev 28]. Disponível em: [www.sbpt.org.br/downloads/.../2 Diagnostico TB doenca ativa.pdf](http://www.sbpt.org.br/downloads/.../2_Diagnostico_TB_doenca_ativa.pdf)
53. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet.* 2006 Apr 22;367(9519):1328-34. PubMed PMID: 16631911.
54. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000 Sep 23;356(9235):1099-104. Review. PubMed PMID: 11009160.
55. Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull.* 2010;93:69-84. Epub 2009 Nov 18. Review. PubMed PMID: 19926636.
56. Li L, Qiao D, Zhang X, Liu Z, Wu C. The immune responses of central and effector memory BCG-specific CD4+ T cells in BCG-vaccinated PPD+ donors were modulated by Treg cells. *Immunobiology.* 2011 Apr;216(4):477-84. Epub 2010 Sep 17. PubMed PMID: 20950889.
57. Rueda CM, Marín ND, García LF, Rojas M. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN- $\gamma$  in human latent and active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2010 Nov;90(6):346-53. Epub 2010 Oct 8. PubMed PMID: 20933471.
58. Chegou NN, Black GF, Kidd M, van Helden PD, Walzl G. Host markers in QuantiFERON supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report. *BMC Pulm Med.* 2009 May 16;9:21. PubMed PMID: 19445695; PubMed Central PMCID: PMC2696407.
59. Frahm M, Goswami ND, Owzar K, Hecker E, Mosher A, Cadogan E, Nahid P, Ferrari G, Stout JE. Discriminating between latent and active tuberculosis with multiple biomarker responses. *Tuberculosis (Edinb).* 2011 May;91(3):250-6. Epub 2011 Mar 10. PubMed PMID: 21393062; PubMed Central PMCID: PMC3090479.
60. LoBue PA, Castro KG. Is it time to replace the tuberculin skin test with a blood test? *JAMA.* 2012 Jul 18;308(3):241-2. PubMed PMID: 22797639.
61. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med.* 2008 Aug 5;149(3):177-84. Epub 2008 Jun 30. Review. PubMed PMID: 18593687; PubMed Central PMCID: PMC2951987.

62. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Apr;161(4 Pt 2):S221-47. Review. PubMed PMID: 10764341.
63. Ruhwald M, Aabye MG, Ravn P. IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Mar;12(2):175-87. Review. PubMed PMID: 22369377.
64. Dhillon NK, Peng F, Ransohoff RM, Buch S. PDGF synergistically enhances IFN-gamma-induced expression of CXCL10 in blood-derived macrophages: implications for HIV dementia. *J Immunol.* 2007 Sep 1;179(5):2722-30. PubMed PMID: 17709485.
65. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):123-8. Review. PubMed PMID: 11175804.
66. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* 2011 Feb;89(2):207-15. Epub 2011 Jan 11. Review. PubMed PMID: 21221121.
67. Karonitsch T, von Dalwigk K, Steiner CW, Blüml S, Steiner G, Kiener HP, Smolen JS, Aringer M. Interferon signals and monocytic sensitization of the interferon- $\gamma$  signaling pathway in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012 Feb;64(2):400-8. doi: 10.1002/art.33347. PubMed PMID: 21953607.
68. Guzzo C, Che Mat NF, Gee K. Interleukin-27 induces a STAT1/3- and NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine profile in human monocytes. *J Biol Chem.* 2010 Aug 6;285(32):24404-11. Epub 2010 Jun 2. Erratum in: *J Biol Chem.* 2012 Mar 9;287(11):8661. PubMed PMID: 20519510; PubMed Central PMCID: PMC2915676.
69. Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun.* 2007 Jun;75(6):3055-61. Epub 2007 Apr 2. PubMed PMID: 17403873; PubMed Central PMCID: PMC1932856.
70. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 2007 Apr;8(4):369-77. Epub 2007 Mar 11. PubMed PMID: 17351619.

71. Qian C, An H, Yu Y, Liu S, Cao X. TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3308-15. Epub 2006 Dec 14. PubMed PMID: 17170125.
72. Campos HS. Medicamentos efetivos sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, padronizados no Brasil - Tratamento da tuberculose. Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. *Pulmão RJ* 2007;16(1):21-31.
73. Gros A, Roussel M, Sauvadet E, Gacouin A, Marqué S, Chimot L, Lavoué S, Camus C, Fest T, Le Tulzo Y. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2012 Mar;38(3):445-52. Epub 2012 Feb 4. PubMed PMID: 22310872.
74. Van Vuuren AJ, van Roon JA, Walraven V, Stuij I, Harmsen MC, McLaughlin PM, van de Winkel JG, Thepen T. CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):5833-8. PubMed PMID: 16670289.
75. Fjaertoft G, Pauksen K, Håkansson L, Xu S, Venge P. Cell surface expression of FcγRI (CD64) on neutrophils and monocytes in patients with influenza A, with and without complications. *Scand J Infect Dis*. 2005;37(11-12):882-9. PubMed PMID: 16308225.
76. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A, Feldmann K, Mollenkopf HJ, Ziegler A, Kaufmann SH. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Jun;85(6):613-21. Epub 2007 Feb 23. PubMed PMID: 17318616.
77. Van de Winkel JG, Capel PJ (1993) Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 14:215–221
78. Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G (1983) Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med* 158:1092–1113
79. te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG (1992) IL-10 stimulates monocyte Fc γ R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-γ, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 149:4048–4052
80. Flynn JL, Chan J (2001) Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19:93–129
81. Kalita A, Verma I, Khuller GK (2004) Role of human neutrophil peptide-1 as a possible adjunct to antituberculosis chemotherapy. *J Infect Dis* 190:1476–1480

82. Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD (1999) *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 163:3898–3906
83. Vanham G, Edmonds K, Qing L, Hom D, Toossi Z, Jones B, Daley CL, Huebner B, Kestens L, Gigase P, Ellner JJ (1996) Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: coactivation with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 103:30–34
84. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(1):95-102. Review. PubMed PMID: 11908649.
85. Schaible UE, Collins HL, Priem F, Kaufmann SH. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med.* 2002 Dec 2;196(11):1507-13. PubMed PMID: 12461085; PubMed Central PMCID: PMC2194267.
86. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):107-17. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):216. PubMed PMID: 11252952.
87. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A, Feldmann K, Mollenkopf HJ, Ziegler A, Kaufmann SH. Ras-associated small GTPase 33A, a novel T cell factor, is down-regulated in patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2005 Oct 1;192(7):1211-8. Epub 2005 Aug 24. PubMed PMID: 16136464.
88. Hovanessian AG, Justesen J. The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie.* 2007 Jun-Jul;89(6-7):779-88. Epub 2007 Feb 20. Review. PubMed PMID: 17408844.
89. Melchjorsen J, Kristiansen H, Christiansen R, Rintahaka J, Matikainen S, Paludan SR, Hartmann R. Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Apr;29(4):199-207. PubMed PMID: 19203244.
90. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393-422. Review. PubMed PMID: 19302046.
91. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):682-7. Epub 2005 Dec 28. PubMed PMID: 16382236.
92. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med.* 2006 Oct 2;203(10):2281-92. Epub 2006 Sep 5. PubMed PMID: 16954372; PubMed Central PMCID: PMC2118095.

93. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006 Oct;12(10):1198-202. Epub 2006 Aug 20. Erratum in: *Nat Med.* 2006 Nov;12(11):1329. PubMed PMID: 16917489.

94. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):350-4. Epub 2006 Aug 20. PubMed PMID: 16921384.

95. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol.* 2006 Nov;80(22):11398-403. Epub 2006 Sep 6. PubMed PMID: 16956940; PubMed Central PMCID: PMC1642188.

96. Beswick EJ, Pinchuk IV, Das S, Powell DW, Reyes VE. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Infect Immun.* 2007 Sep;75(9):4334-41. Epub 2007 Jun 11. PubMed PMID: 17562772; PubMed Central PMCID: PMC1951191.

97. Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3000-9. PubMed PMID: 16493058.

98. Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martínez GJ, Quiroga MF, Abbate E, Musella RM, Chuluyan HE, García VE. Programmed death (PD-1): PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):116-25. PubMed PMID: 18566376.

99. Alvarez IB, Pasquinelli V, Jurado JO, Abbate E, Musella RM, de la Barrera SS, García VE. Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2010 Aug 15;202(4):524-32. PubMed PMID: 20617899.

100. Ringshausen FC, Schablon A, Nienhaus A. Interferon-gamma release assays for the tuberculosis serial testing of health care workers: a systematic review. *J Occup Med Toxicol.* 2012 Jun 18;7(1):6. PubMed PMID: 22537915; PubMed Central PMCID: PMC3377540.

101. Syed Ahamed Kabeer B, Raman B, Thomas A, Perumal V, Raja A. Role of QuantiFERON-TB gold, interferon gamma inducible protein-10 and tuberculin skin test in active tuberculosis diagnosis. *PLoS One.* 2010 Feb 4;5(2):e9051. PubMed PMID: 20140219; PubMed Central PMCID: PMC2816212.



102. Kabeer BS, Sikhmani R, Raja A. Comparison of interferon gamma and interferon gamma-inducible protein-10 secretion in HIV-tuberculosis patients. *AIDS*. 2010 Jan 16;24(2):323-5. PubMed PMID: 20010069.
103. Ritz, C., A. N. Spiess. 2008. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* Jul 1:1549-51.
104. R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Acessado em: 7 abr. 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org>.
105. Rebrikov DV, Trofimov Dlu. [Real-time PCR: approaches to data analysis (a review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2006 Sep-Oct;42(5):520-8. Review. Russian. PubMed PMID: 17066950.
106. Basso D, Pesarin F, Salmaso L, Solari A. Permutation Tests for Stochastic Ordering and ANOVA. *Lecture Notes in Statistics*, 2009, Volume 194, 1-35, DOI: 10.1007/978-0-387-85956-9\_1
107. Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, Kofoed K, Eugen-Olsen J, Ravn P. CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes Infect*. 2007 Jun;9(7):806-12. Epub 2007 Mar 6. PubMed PMID: 17533146.
108. Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ, Quinn C, Blankenship D, Dhawan R, Cush JJ, Mejias A, Ramilo O, Kon OM, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 2010 Aug 19;466(7309):973-7. PubMed PMID: 20725040.
109. Knudsen TB, Gustafson P, Kronborg G, Kristiansen TB, Moestrup SK, Nielsen JO, Gomes V, Aaby P, Lisse I, Møller HJ, Eugen-Olsen J. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Sep;11(9):730-5. PubMed PMID: 16104988.
110. Cliff JM, Lee JS, Constantinou N, Cho JE, Clark TG, Ronacher K, King EC, Lukey PT, Duncan K, Van Helden PD, Walzl G, Dockrell HM. Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. *J Infect Dis*. 2012 Aug 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22872737.

## **ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecimento para participação em projeto**

### **Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto**

**Título do projeto:** Estudo de Biomarcadores para o Diagnóstico de Infecções Micobacterianas.

**Nome do pesquisador responsável:** Dr. Geraldo Moura Batista Pereira e Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.

**Nome dos médicos responsáveis:** Dr. Geraldo Moura Batista Pereira, Dr. Hélio Ribeiro Siqueira, Dr. **Domenico** Capone, Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro e Dr. José Augusto Nery.

**Nomes e telefones de contato para questões e problemas:** Dr. Geraldo Moura Batista Pereira Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani: 21-2587-6144 ou 21-2598-4287.

**Financiador do projeto:** Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj)

Prezado (a) cliente. A tuberculose e a hanseníase são doenças sérias e somente a pesquisa tem trazido progressos no conhecimento e tratamento destas enfermidades. Estamos iniciando uma nova pesquisa que tem por finalidade identificar pessoas com alto risco de adquirir estas doenças e a possibilidade de evitá-las.

Esta pesquisa consiste em um conjunto de análises, em pessoas com tuberculose pulmonar ou hanseníase, seus contatos familiares, pessoas com artrite reumatóide e em indivíduos saudáveis, com o objetivo de definir os testes que poderão ser usados para indicar o risco de adoecimento.

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa e é importante que leia esse documento com atenção para decidir se você aceita ou não ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como o de todos os pacientes que freqüentam esse serviço clínico, não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar da pesquisa e a qualquer momento quiser desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente. Não haverá pagamento por sua participação no presente projeto. Com sua participação, você terá apenas a satisfação de ter contribuído para a melhoria da saúde de muitas pessoas.

Para a pesquisa, além dos exames clínicos e laboratoriais de rotina para confirmação da tuberculose, da hanseníase ou da artrite (RX de tórax, exames de escarro espontâneo ou induzido, PPD, exames de sangue comuns, pesquisa de muco nasal, pesquisa de anticorpos no sangue, teste para HIV), serão colhidos 30 mL de sangue de sua veia, uma amostra de saliva e uma amostra do muco nasal (nos casos de hanseníase) para detecção de anticorpos e outros marcadores de imunidade contra os agentes causadores da hanseníase e tuberculose. O sangue também poderá ser utilizado para tipagem

de HLA e análise de polimorfismos gênicos por análise de DNA, que são exames mais especiais.

Esses materiais serão armazenados no Departamento de Patologia e Laboratórios da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro e no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, podendo ser utilizado para outras pesquisas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Caso o voluntário participante do projeto desejar, ele poderá entrar em contacto com o pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados.

Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, vejam a seção seguinte.

### **Procedimento e métodos usados**

Coleta de sangue: Um profissional bem treinado neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aquele usado quando se tira sangue para exame.

Desconfortos e riscos: Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (mancha roxa) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e não causará nenhuma complicação.

Coleta de saliva: Coloca-se um pedaço de algodão odontológico embaixo da língua da pessoa, durante 5 minutos. Após este tempo, retira-se o algodão com o auxílio de uma pinça e o mesmo é transferido para um tubo apropriado. Desconfortos e riscos: Pode ocorrer vômito, o que é muito raro. Não existem riscos na retirada desse material.

Coleta de secreção muco nasal: Uma pessoa treinada irá passar um cotonete na região mais adequada do nariz. A seguir este cotonete será colocado em um tubo contendo solução salina. Desconfortos e riscos: São cócegas na região onde o cotonete será passado e espirros. Não existem riscos na retirada desse material.

**Benefícios:** Os exames realizados neste estudo poderão contribuir para o acompanhamento médico de casos com suspeita de hanseníase ou tuberculose. Caso seja um voluntário saudável, você não terá nenhum benefício direto, porém esse estudo beneficiará futuramente toda a população, já que permitirá o diagnóstico e o tratamento da tuberculose e da hanseníase num estágio bem inicial da doença, diminuindo a ocorrência de seqüelas, e contribuindo para a interrupção da transmissão destas doenças.

**Confiabilidade:** As pessoas que vão puncionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constará o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra.

**Responsabilidade:** A comissão de Ética responsabilizará o coordenador pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o mesmo.

**Declaração**

O médico da equipe de pesquisa colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar os pesquisadores responsáveis: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira e Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para me recusar a participar do estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Assinar este documento significa que li as informações deste termo de consentimento.

Voluntário participante no estudo:

Nome:

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Pesquisador supervisor da assinatura do termo de consentimento:

Nome:

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_