

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MELINA DE BARROS PINHEIRO**

**IMUNOFENOTIPAGEM E PERFIL DE CITOCINAS DE LINFÓCITOS  
(CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  E  $\gamma\delta$  DE PACIENTES COM APRESENTAÇÕES  
RADIOLÓGICAS NÃO AVANÇADAS E AVANÇADAS DA  
TUBERCULOSE PULMONAR**

**Belo Horizonte – MG**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MELINA DE BARROS PINHEIRO**

**IMUNOFENOTIPAGEM E PERFIL DE CITOCINAS DE LINFÓCITOS  
(CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  E  $\gamma\delta$  DE PACIENTES COM APRESENTAÇÕES  
RADIOLÓGICAS NÃO AVANÇADAS E AVANÇADAS DA  
TUBERCULOSE PULMONAR**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria das Graças Carvalho  
Coorientador Prof. Dr Vicente de Paulo C. P. Toledo  
Coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Spíndola de Miranda

**Belo Horizonte – MG**

**2010**

P654i Pinheiro, Melina de Barros  
Imunofenotipagem e perfil de citocinas de linfócitos (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>)  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  de pacientes com apresentações radiológicas não avançadas e avançadas da tuberculose pulmonar / Melina de Barros Pinheiro. – 2010.  
105 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo C. P. Toledo.  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Silvana Spíndola de Miranda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Tuberculose – Teses. 2. Linfócitos – Teses. 3. Citocinas – Teses. 4. Imunologia celular – Teses. 5. Marcadores biológicos – Teses. I. Título. II. Carvalho, Maria das Graças. III. Toledo, Vicente de Paulo C. P. IV. Miranda, Silvana Spíndola de. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD:615.995

*Dedico este trabalho*

*À Deus por me abençoar a cada dia.*

*Ao meu querido orientador Prof. Vicente, pelos ensinamentos, dedicação, carinho e amizade.*

*À minha querida coorientadora Profª Silvana pela paciência, grandes ensinamentos e amizade.*

*Aos meus pais e irmãos pelo amor e apoio incondicional e ao Luis pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Vicente Toledo por todos esses anos de convívio e amizade. Muito obrigada pela dedicação, carinho e atenção. Obrigada por sempre acreditar e confiar em mim. Você é o principal responsável por essa vitória.

À Prof<sup>a</sup> Tânia Mara P. Dabés Guimarães pela colaboração, carinho e principalmente amizade. Obrigada por tudo que você me ensinou, pelo apoio, incentivo e pelo convívio ao lado de uma pessoa tão iluminada como você.

À Prof<sup>a</sup> Maria das Graças Carvalho pelo carinho, amizade e apoio. Muito obrigada por me orientar e permitir a realização desse sonho.

Ao Renato Avelar e Danielle Vitelli pela colaboração, ensinamentos, disponibilidade sempre imediata, dedicação e amizade. Muito obrigada.

Ao Dr. Olindo A. Martins Filho pela colaboração e ensinamentos essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

Ao pessoal do laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitorização – Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ, pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação. Muito obrigada.

Ao Farmacêutico José Geraldo do setor de coletas do Hospital das Clínicas da UFMG, pela simpatia e disposição em sempre colaborar com nosso trabalho. Muito obrigada.

Ao CNEN/CDTN (Comissão Nacional de Energia Nuclear/Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear) pela grande ajuda em irradiar nossos antígenos, e em especial, a Perpétua e Timóteo pelo convívio, disponibilidade e grande ajuda. Muito obrigada.

Ao pessoal do laboratório do prof Carlos Chaves que gentilmente nos emprestou e auxiliou com a utilização do sonicador. Muito obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG pela convivência, apoio e amizade.

Ao prof. Rômulo Teixeira de Mello pela amizade, colaboração e companheirismo durante o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada.

Aos professores, colegas e funcionários da pós-graduação da Faculdade de Farmácia da UFMG que acompanharam o desenvolver deste projeto.

Aos meus pais e meus irmãos Welbinho e Marina, que me apoiaram em todos os momentos e sempre confiaram em mim. Muito obrigada pelo amor, carinho e confiança.

Ao Luis por estar ao meu lado em todas as etapas deste trabalho, sempre me acalmando e incentivando. Muito obrigada pelo amor e compreensão.

As minhas queridas amigas Soraya, Larissa e Pollyana, pelo incentivo, amizade e motivação nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por estarem presentes em minha vida.

Aos meus tios, primos, avó e todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para realização desta etapa e torceram por mim. Muito obrigada.

Aos pacientes que contribuíram voluntariamente com este estudo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os professores e mestres que passaram pela minha vida, pelos ensinamentos e dedicação.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

*“Toda pesquisa é um permanente início-reinício em ciclos convergentes que representam a expressão pessoal cada vez mais livre, produtiva e construtiva em prol do benefício de todos.”*

*Sonia Maria Mello Cerato*

## RESUMO

Apesar de ser uma doença tratável, a tuberculose continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública em diversas regiões do mundo, mesmo sendo uma doença tratável. A imunidade celular é muito importante para a defesa do organismo contra a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente macrófagos, células *Natural Killer*, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Atualmente, os linfócitos duplo negativos  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  tem sido avaliados quanto ao seu papel na defesa contra patógenos intracelulares. O objetivo deste trabalho foi investigar se os pacientes com as apresentações radiológicas não avançadas e avançadas da tuberculose pulmonar possuem alguma alteração quanto aos parâmetros da imunidade celular e quanto ao padrão de citocinas produzidas por linfócitos duplo negativos  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ . Avaliou-se um total de 20 pacientes com tuberculose pulmonar que foram classificados em apresentação radiológica não avançada (10 pacientes) e apresentação radiológica avançada (10 pacientes) e 10 controles sem tuberculose. Realizaram-se duas abordagens neste estudo: a avaliação “ex-vivo” e após cultura das células *in vitro*. Para o estudo “ex-vivo” analisou-se os marcadores CD4, CD8,  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$ , CD28, CD69 e HLA-DR, através da citometria de fluxo, nos linfócitos do sangue periférico. Para a dosagem de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 utilizou-se o sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. A análise estatística dos resultados obtidos revelou uma menor expressão de linfócitos duplo negativos  $\gamma\delta$  e maior expressão de linfócitos duplo negativos  $\alpha\beta$  na apresentação radiológica avançada da tuberculose quando comparados aos pacientes com apresentação radiológica não avançada. A expressão da molécula co-estimuladora CD28 e dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR está aumentada nas células duplo negativas  $\gamma\delta$  dos pacientes com apresentação radiológica não avançada o que demonstra um perfil de prévia ativação dessas células nessa apresentação radiológica da doença. Quanto à citocinas produzidas após estimulação antigênica dos leucócitos, observou-se que ambas as células produzem maiores níveis de citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na tuberculose apresentação radiológica não avançada enquanto que produzem maiores níveis de citocina imunorregulatória IL-10 na apresentação radiológica avançada. Além disso, os resultados mostram que os linfócitos duplo negativos  $\gamma\delta$  são melhores produtoras de IFN- $\gamma$  enquanto que os linfócitos duplo negativos  $\alpha\beta$  são melhores produtoras de IL-10. Estes resultados mostraram que os linfócitos duplo negativos se encontram ativados na corrente sanguínea de pacientes com tuberculose e que a avaliação da expressão de CD28, CD69, HLA-DR e o percentual de linfócitos duplo negativos  $\gamma\delta$  foi capaz de diferenciar as duas apresentações radiológicas estudadas. Além disso, ambas as células exibiram um perfil de citocinas inflamatórias na apresentação radiológica não avançada e perfil imunorregulatório na apresentação avançada, o que também permitiu a diferenciação entre as duas apresentações radiológicas estudadas. Esse trabalho analisou de forma inédita a participação dos linfócitos duplo negativos em diferentes apresentações radiológicas da tuberculose pulmonar e sugere a possibilidade da utilização desses marcadores no acompanhamento da evolução clínica dos pacientes, porém, para isso, são necessários maiores estudos envolvendo um número maior de pacientes avaliados ao longo do tratamento farmacológico.

**PALAVRAS-CHAVES:** tuberculose, linfócitos duplo negativos, CD28, CD69, HLA-DR, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10.

## ABSTRACT

Despite of being a treatable disease, tuberculosis remains a major public health problem in various regions of the world. Cellular immunity is very important to defend the body against infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*, mainly macrophages, natural killer cells, lymphocyte T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>. Nowadays the double-negative  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  lymphocytes have been evaluated for their role in the defense against intracellular pathogens. The aim of the present study was to investigate whether patients with non-advanced and advanced radiological presentations of pulmonary tuberculosis have any changes regarding the parameters of cellular immunity and on the pattern of cytokines produced by double negative  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  lymphocytes. A total of 20 patients with pulmonary tuberculosis were evaluated and they were classified as non-advanced radiological presentation (10 patients), advanced radiological presentation (10 patients) and 10 controls without tuberculosis. It was used two approaches in this study: the evaluation of “ex-vivo” and after in vitro culture. For the “ex-vivo” study, the markers CD4, CD8,  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$ , CD28, CD69 and HLA-DR were analyzed by flow cytometry in peripheral blood lymphocytes. For the IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokines determination, it was used the culture supernatant of mononuclear cells from peripheral blood stimulated with antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Statistical analysis of results showed a lower expression of double-negative  $\gamma\delta$  lymphocytes and increased expression of double-negative  $\alpha\beta$  lymphocytes in patients with advanced radiological presentation of tuberculosis when compared to patients with non-advanced radiological presentation. The expression of co-stimulatory molecule CD28 and activation markers CD69 and HLA-DR is increased in double-negative  $\gamma\delta$  cells of patients with non-advanced radiological presentation which shows a profile of prior activation of these cells in this radiographic appearance of the disease. In relation to the cytokines produced after antigen stimulation of leukocytes, it was observed that both cells produce higher levels of inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in tuberculosis with non-advanced radiological presentation while producing higher levels of immunoregulatory cytokine IL-10 in advanced radiological presentation. Furthermore, the results show that the double negative  $\gamma\delta$  lymphocytes are better producers of IFN- $\gamma$  while the double negative  $\alpha\beta$  lymphocytes are better producers of IL-10. These results showed that the double negative lymphocytes are activated in the bloodstream of patients with tuberculosis and that the evaluation of the expression of CD28, CD69, HLA-DR and the percentage of double negative  $\gamma\delta$  lymphocytes was able to differentiate both radiological presentations studied. Moreover, both cells exhibited a profile of inflammatory cytokines in non-advanced radiological presentation and immunoregulatory profile in advanced radiological presentation, which also allowed the differentiation between the two groups studied. This study innovatively analyzed the participation of the double negative lymphocytes in different radiological presentations of pulmonary tuberculosis and suggests the possibility of using these markers in monitoring the clinical course of patients. However, further studies are needed involving a larger number of patients evaluated throughout pharmacological treatment.

## LISTA DE FIGURAS

**1** Infecção, evolução da doença e mecanismos imunes ativados durante a infecção pelo *M. tuberculosis*. IFN – interferon; IL- interleucina; LT – linfocina; RNI – intermediário reativo de nitrogênio; RNO – intermediário reativo de oxigênio; TNF – fator de necrose tumoral; TLR – receptor tipo Toll.

**2** Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/ $\alpha\beta$  versus FL3/CD4 e utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas em R1.....48

**3** Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$  por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD4 versus FL1/ $\alpha\beta$  utilizado para quantificar o percentual de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  em R2. (C) Gráficos de distribuição puntual FL3/CD4 versus FL1/ $\gamma\delta$  utilizado para quantificar o percentual de linfócitos  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$  em R2.....49

**4** Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$  ativados (HLA-DR<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>) por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD4 versus FL1/ $\alpha\beta$  (R2) utilizado para selecionar a população celular  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$ . (C) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD4 versus FL1/ $\gamma\delta$  (R2) utilizado para selecionar a população celular  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$ . (D, E e F) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1and R2”, gráficos de FSC versus FL2/HLA-DR ou CD69 ou CD28, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-HLA-DR^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-CD69^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-CD28^+$  ou  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-HLA-DR^+$ ,  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-CD69^+$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-CD28^+$ .....51

**5** Sequência de procedimentos utilizados para as análises por citometria de fluxo das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 nos linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$ . (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B e C) Gráfico de distribuição puntual FL1/ $\alpha\beta$  versus FL3/CD4 versus FL1/ $\gamma\delta$  versus FL3/CD4 utilizado para selecionar a população celular  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$ . (D, E e F) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1andR2” gráfico de FSC versus FL2/IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  ou IL-10, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-IFN-\gamma^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-TNF-\alpha^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-IL-10^+$  ou  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-IFN-\gamma^+$ ,  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-TNF-\alpha^+$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-IL-10^+$ .....53

**6** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup> $\alpha\beta^+$  e CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta^+$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....56

**7** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta^+$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controle saudáveis TT. As diferenças significativas (P<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na

apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....58

**8** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e controles saudáveis indivíduos TT. As diferenças significativas (P<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....59

**9** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas (P<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....60

**10** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas (P<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....61

**11** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> após cultura de PBMC por 48 horas em meio RPMI-1640 na presença de antígeno do bacilo *M. tuberculosis* cepa H37-Rv (cultura estimulada - CE) de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas (P<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle CE: cultura estimulada de indivíduos TT (n=10); TBNAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....63

**12** Percentual médio de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> após cultura de PBMC por 48 horas em meio RPMI-1640 na presença de antígeno do bacilo *M. tuberculosis* cepa H37-Rv (cultura estimulada - CE) de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas (P<0,05) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle CE: cultura estimulada de indivíduos TT (n=10); TBNAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).....64

**13** Análise das alterações encontradas no perfil fenotípico após “estudo ex-vivo” e da produção de citocinas *in vitro* pelos linfócitos DN αβ e γδ dos pacientes portadores das diferentes apresentações radiológicas da TB. A orientação das setas representa elevação ou diminuição estatisticamente significativa de um dos parâmetros com relação ao grupo controle e a outra apresentação radiológica da TB. TBNAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica não avançada. TBAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica avançada.....67

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b> Anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), tricolor (TC) e ficoeritrina (PE) utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e marcadores de ativação.....	43
<b>2</b> Anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina (PE) utilizados para análise da expressão de citocinas intracelular.....	47
<b>3</b> Indivíduos (n), distribuídos por sexo, faixa etária e média de idade nos grupos estudados.....	55
<b>4</b> Média e desvio padrão dos valores absolutos de leucócitos totais, linfócitos e índices CD4 <sup>+</sup> αβ <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> αβ nos grupos estudados.....	57
<b>5</b> Frequência (%) da expressão de marcadores de ativação após estudo “ex-vivo” e produção de citocinas <i>in vitro</i> dos linfócitos CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> αβ <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> γδ <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com TBNAV e TBAV.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BSA	Albumina sérica bovina
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD1	Molécula expressa em células Langerhans, interdigitais e timócitos corticais
CD3	Molécula expressa em linfócitos T
CD4	Molécula expressa em linfócitos T auxiliares
CD8	Molécula expressa em linfócitos T citotóxicos
CD28	Molécula co-estimulatória
CD69	Marcador de ativação celular recente
CD95	Receptor de indução de apoptose
CMV	Citomegalovírus
COEP	Comitê de ética em pesquisa
DN	Duplo negativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fas	Receptor de indução de apoptose
FasL	Ligante do receptor de indução de apoptose
FGF-9	Fator de crescimento para fibroblasto
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Tamanho
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano
IFN	Interferon

IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico <i>sintetase</i>
KGF	Fator de crescimento para queratinócitos
MFF	Solução fixadora
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MoAb	Anticorpo monoclonal
NK	<i>Natural killer</i>
NK T	Subpopulação de células T que expressam em sua superfície receptores de células NK
NKTI	Células NKT invariantes
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salínico
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PE	Ficoeritrina
PMA	Acetato miristato de forbol
PPD	Derivado protéico purificado
RX	Radiograma de tórax
SSC	Granulosidade
TB	Tuberculose
TBAV	Tuberculose apresentação radiológica avançada
TBNAV	Tuberculose apresentação radiológica não avançada
TC	Tricolor
TCR	Molécula expressa por linfócitos T que tem a função de reconhecer o complexo CPH-Antígeno.
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta

Th1	Linfócitos T auxiliar, subgrupo/tipo Th1
Th2	Linfócitos T auxiliar, subgrupo/tipo Th2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TT	Teste tuberculínico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i>
$\alpha\beta$	alfa/beta
$\gamma\delta$	gama/delta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	40
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	40
<b>4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
<b>4.1 Normas éticas</b> .....	41
<b>4.2 População</b> .....	41
<b>4.3 Critérios de inclusão no estudo</b> .....	43
<b>4.4 Critérios de exclusão no estudo</b> .....	43
<b>4.5 Estudos laboratoriais</b> .....	44
<b><u>4.5.1 Obtenção de amostras de sangue</u></b> .....	44
<b><u>4.5.2 Testes Imunológicos</u></b> .....	44
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	56
<b>6 RESULTADOS</b> .....	57
<b>6.1 População estudada</b> .....	57
<b>6.2 Análise “ex-vivo” do fenótipo celular dos leucócitos do sangue periférico</b> .....	58
<b><u>6.2.1 Linfócitos CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup></u></b> .....	58
<b><u>6.2.2 Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup></u></b> .....	59
<b><u>6.2.3 Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></u></b> .....	60
<b><u>6.2.4 Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup></u></b> .....	61
<b><u>6.2.5 Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></u></b> .....	62
<b>6.3 Avaliação do padrão de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico após cultura <i>in vitro</i></b> .....	64
<b><u>6.3.1 Expressão de IFN-γ, TNF-α e IL-10 em Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup></u></b> .....	64
<b><u>6.3.2 Expressão de IFN-γ, TNF-α e IL-10 em Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup></u></b> .....	65
<b>6.4 Síntese dos resultados</b> .....	67
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	70

<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O principal agente infeccioso da tuberculose (TB) humana, o *Mycobacterium tuberculosis*, foi descoberto em 1882 por Robert Koch, que isolou e descreveu o bacilo, conseguindo seu cultivo e reproduzindo a doença em animais. Outras espécies como *M. bovis* e alguns patógenos oportunistas do complexo *M. avium-intracellulare*, também podem causar a doença, porém com menor frequência (KRITSKI *et al.*, 2000). O gênero *Mycobacterium* apresenta como característica comum resistir à descoloração pelo álcool-ácido, devido ao alto teor de lipídios presentes em sua membrana (BRASIL 2002a, 2005; NORTH & JUNG, 2004; WATTERSON & DROBNIEWSKI, 2000).

Apesar de ser uma doença tratável, a TB continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública em diversas partes do mundo. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), um terço da população mundial está infectada pelo bacilo, sendo que em 2006 ocorreram 9,2 milhões de novos casos e 1,7 milhões de mortes por TB em todo mundo (WHO, 2008). No Brasil, a taxa de infecção também é elevada. Segundo dados do Ministério da Saúde foram notificados 53.144 casos de TB em 2008, sendo que 4.774 desses casos foram notificados no estado de Minas Gerais, colocando-o na quarta posição entre os estados com maiores números de casos no país.

A persistência da doença é devida principalmente ao descuido e má administração dos programas de controle pelos governos, à pobreza, ao crescimento da população e migração e ao aumento significativo dos casos em regiões com alta prevalência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2006a).

Dentre as medidas de controle disponíveis para TB encontra-se a vacinação pelo Bacilo Calmette-Guérin (BCG). A utilização da vacina BCG foi adotada largamente a partir de 1920, incentivada pela OMS e *United Nations Children's Fund* (UNICEF) a partir de 1948. A maioria dos países no mundo adota dose única de BCG ao nascer, conforme recomendação da OMS, pois considera ausência de evidências que sustentem a utilização de doses adicionais (WHO, 1995). O Ministério da Saúde no

Brasil, na década de noventa, introduziu uma segunda dose da vacina, porém, recentemente, suspendeu o uso fundamentado em ensaios clínicos controlados, randomizados, realizados em Salvador e Manaus, nos quais a segunda dose de BCG não apresentou proteção (RODRIGUES *et al.*, 2005), similar a estudo caso-controle, que avaliou a segunda dose de BCG em Recife (DANTAS *et al.*, 2006).

A atual estratégia de vacinação tem sido considerada adequada principalmente em regiões com alta incidência de TB, protegendo contra a ocorrência de formas graves da TB como miliar e meningite tuberculosa, principalmente em crianças. Com relação a essas formas, o efeito protetor da primeira dose da vacina BCG segundo estudos experimentais (ensaios clínicos) e observacionais (caso-controle) realizados em vários países apresentaram proteção acima de 80%, utilizando-se as diferentes cepas de vacina BCG (Copenhague, Moreau, Glaxo) (ANTAS & CASTELLO-BRANCO, 2008; CAMARGOS *et al.*, 1988; COMSTOCK & EDWARDS, 1972; COSTA *et al.*, 1991; PEREIRA *et al.*, 2007). Metanálises realizadas também apontaram uma medida sumarizada do efeito protetor da primeira dose da vacina BCG entre 73% e 86%. (COLDITZ *et al.*, 1995; TRUNZ *et al.*, 2006). No Brasil, três estudos caso-controle em diferentes cidades apontaram também elevada proteção da primeira dose da vacina BCG: 84,5%, 93,3% e 99,5%. (CAMARGOS *et al.*, 1988; DOURADO *et al.*, 2003; HEWINSON, 2005). Com relação ao efeito protetor da vacina BCG para TB pulmonar, apresentação radiológica clínica de importância para o controle da doença, esse apresentou variação entre zero e 80%, avaliado por meio de ensaios clínicos e estudos de caso-controle em diferentes países desde a década de 40. (ANTAS & CASTELLO-BRANCO, 2008; ARONSON, 1948; COLDITZ *et al.*, 1994; COLLINS & LISLE, 1977; MICELI *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 1993; ROMANUS, 2006; ROSENTHAL *et al.*, 1961). Essa variação da proteção tem sido atribuída a diversos fatores, a exemplo de diferenças na exposição à micobactérias ambientais, características genéticas da população, diferenças na virulência do *M. tuberculosis*, alto risco de re-infecção, diferenças nas cepas de BCG e diferenças nutricionais.

A transmissão da TB geralmente ocorre de pessoa a pessoa, principalmente através da inalação de perdigotos contaminados com bacilos viáveis. A fala, o espirro e,

principalmente, a tosse de um doente com TB pulmonar bacilífera lança no ar gotículas, de tamanhos variados, contendo no seu interior o bacilo (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005; CONDE *et al.*, 2009; KRITSKI *et al.*, 2000).

Após exposição ao *M. tuberculosis*, somente 10-30% dos indivíduos se tornam infectados, indicando que muitos humanos desenvolvem infecção abortiva. Daqueles que se tornam infectados (adquirem hipersensibilidade retardada ao bacilo), 90% ou mais não desenvolvem TB, o que significa que eles são capazes de resolver a infecção completamente, ou reduzir a carga bacilífera para níveis incapazes de causar doença (BHATT & SALGAME, 2007; MANABE & BISHAI, 2000; NORTH & JUNG, 2004).

Dessa forma, um indivíduo que, pela primeira vez recebe uma carga infectante de bacilos da TB (primo-infecção), da qual um ou mais bacilos alcançam o pulmão, vencendo as defesas da árvore respiratória, apresentará reação inflamatória e exsudativa de tipo inespecífica. O organismo demora em média 15 dias para montar uma imunidade específica contra o bacilo. Nesse período, os bacilos podem, a partir da lesão pulmonar, atingir a via linfo-hematogênica, comprometendo os linfonodos, fígado, baço, medula óssea, rins e o sistema nervoso. Essa disseminação, de poucos bacilos, é considerada “benigna”, durante a qual, os bacilos ficarão latentes ou serão destruídos pela ação da imunidade que se instalará (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005; KRITSKI *et al.*, 2000).

No início da 3ª semana após a infecção pelo bacilo, o organismo normal reconhecendo a presença da micobactéria é capaz de mobilizar o sistema de defesa imunológico específico visando à destruição ou inativação do agente agressor. Passa a haver, então, no local da inoculação inicial no pulmão, um foco pequeno, arredondado, esbranquiçado, de consistência amolecida e constituído, principalmente, por material caseoso conhecido como granuloma. À associação do foco primário aos gânglios satélites da sua região dá-se o nome de complexo primário de Ranke. Cerca de 90% da população infectada consegue bloquear o avanço do processo, a partir da formação do complexo primário de Ranke, permanecendo apenas como infectados. (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005;

KRITSKI *et al.*, 2000). Por outro lado, dentre aqueles 10% de indivíduos que não conseguem conter a evolução da infecção pelo bacilo da TB, aproximadamente 5% desenvolverão a chamada TB primária. Ela ocorre durante a primo-infecção, podendo evoluir tanto a partir do foco pulmonar quanto do foco ganglionar ou, então, em consequência da disseminação hematogênica (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005; KRITSKI *et al.*, 2000). Por outro lado, o restante dos indivíduos que sofreram a primo-infecção irá desenvolver a doença tardiamente devido ao crescimento lento do granuloma. Portanto, daqueles primo-infectados, 5% adoecerão tardiamente em consequência do recrudescimento de algum foco já existente em seu organismo (reativação endógena). Também pode ocorrer a reinfecção exógena, ou seja, o paciente adoecer por receber nova carga bacilar do meio externo (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005; KRITSKI *et al.*, 2000). Dessa forma, embora a infecção latente seja clinicamente silenciosa e não contagiosa, ela pode se reativar e causar a TB pulmonar forma mais prevalente em adultos. Por isso a compreensão da latência e reativação da doença pode ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para controle e tratamento da TB. Como já dito anteriormente, os bacilos podem se espalhar pelo organismo a causar a TB extrapulmonar. Esta disseminação pode acontecer em dois momentos distintos: durante a primo-infecção, quando a imunidade específica ainda não está desenvolvida e após a primo-infecção, a qualquer tempo, se houver uma queda na capacidade do hospedeiro em manter o bacilo nos seus sítios de implantação primária. No primeiro caso, a carga bacilar geralmente é pequena, e o organismo é capaz, após ativação da imunidade adaptativa, de conter os bacilos no local da implantação indefinidamente. Entretanto, se o desenvolvimento da imunidade celular não acontece, haverá um desequilíbrio entre a imunidade e o bacilo, o que representa condição básica para o adoecimento. Se a disseminação ocorrer após a primo-infecção, sua intensidade será diretamente proporcional à queda da resposta imune do indivíduo, dependendo também da característica passageira ou definitiva da imunodeficiência (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005; KRITSKI *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas da TB são muito variáveis e dependem de vários fatores relacionados com o hospedeiro, com o bacilo e com a interação bacilo-hospedeiro. (ATS, 2000). Os sintomas mais freqüentes e característicos da TB pulmonar são

tosse, expectoração, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (ATS, 2000; BRASIL, 2002a, 2005; CONDE *et al.*, 2009; KRITSKI *et al.*, 2000). A TB pode ainda se expressar por formas disseminadas atingindo a pleura, olho, linfonodo, pele, trato gastrintestinal e outras. (BRASIL, 2002a; KRITSKI *et al.*, 2000).

Considerando que as manifestações clínicas da TB são bastante inespecíficas, o diagnóstico da doença deve ser realizado levando-se em consideração, além da sintomatologia, o histórico pessoal do paciente e os resultados dos exames complementares. Dentre os principais exames destacam-se os métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura para micobactéria) e outros que auxiliam como o radiograma do tórax (RX) para o diagnóstico da TB pulmonar e o teste tuberculínico (TT). O exame anátomo-patológico (histológico e citológico) e exames bioquímicos são empregados principalmente na investigação das formas extra pulmonares. Além dessas existem outras metodologias sendo empregadas para o diagnóstico da TB como as técnicas de biologia molecular e os métodos automatizados ou semi-automatizados para detecção do crescimento bacteriano em meios líquidos possibilitando um diagnóstico mais precoce, com a detecção em uma a três semanas. Como exemplos desses métodos pode-se citar MGTI<sup>®</sup>, MB/BacT<sup>®</sup>, BACTEC 9000<sup>®</sup>, BACTEC-MGTI 960<sup>®</sup>, MB REDOX<sup>®</sup>, ESP 11<sup>®</sup>, dentre outros. Por outro lado, devido ausência de provas consistentes quanto à sensibilidade, especificidade e valores preditivos, as técnicas sorológicas não são utilizadas na rotina laboratorial (BRASIL, 2002a, 2002b, 2005; CASTELO FILHO *et al.*, 2004; CONDE *et al.*, 2009).

O RX é auxiliar no diagnóstico da TB, justificando-se sua utilização nos casos suspeitos de sintomáticos respiratórios. Nesses pacientes, o RX permite a seleção de portadores de imagens sugestivas de TB ou de outra patologia, sendo indispensável submetê-los a exame bacteriológico para se fazer um diagnóstico correto. O estudo radiológico tem, ainda, importante papel para caracterizar a forma da TB (pleural ou pulmonar) e na diferenciação de outras pneumopatias. O RX, em pacientes com baciloscopia positiva, tem como função principal observar a extensão das lesões, avaliar doença pulmonar associada que necessite de tratamento

concomitante, além de permitir avaliação da evolução radiológica dos pacientes, sobretudo naqueles que não responderem à quimioterapia (BRASIL, 2002a,b).

Ao exame radiológico a lesão inicial da TB caracteriza-se por pequenas opacidades nodulares, cuja extensão não ultrapassa o espaço intercostal ou a região apical, sendo, por conseguinte, denominada lesão mínima ou infiltrado precoce. Este infiltrado precoce é assintomático durante algum tempo, fato este que reforça o valor dos exames radiográficos notadamente entre os contatos. As pequenas opacidades tendem a progredir, envolvendo o lobo, ocorrendo caseificação de áreas mais ou menos extensas e aparecimento de imagens cavitárias, o mais importante dado radiológico desta forma. A cavitação implica a possibilidade de complicações tanto relacionadas com a disseminação canalicular quanto em razão da erosão de vasos arteriais, originando os pseudo-aneurismas de Rasmussen, responsáveis por hemoptises vultosas, às vezes fulminantes. As cavidades são surpreendidas no curso da doença em mais da metade dos casos. Têm paredes espessas, podem ser únicas ou múltiplas, variando entre alguns milímetros a vários centímetros de diâmetro (BRASIL, 2002a,b).

Os resultados dos exames radiológicos do tórax deverão obedecer à seguinte classificação:

- Normal – os que não apresentam imagens patológicas nos campos pulmonares.
- Seqüela – os que apresentam imagens sugestivas de lesões cicatriciais.
- Suspeito – os que apresentam imagens sugestivas de TB (adenomegalias hilares e/ou paratraqueais (gânglios mediastínicos aumentados de volume); pneumonias com qualquer aspecto radiológico, de evolução lenta, às vezes associadas a adenomegalias mediastínicas, ou que cavitam durante a evolução; infiltrado micro nodular difuso (padrão miliar).
- Outras doenças – os que apresentam imagens sugestivas de pneumopatia não tuberculosa (BRASIL, 2002a,b).

AL-MOAMARY *et al.* (1999) classificam TB por meio das lesões pulmonares avaliadas pelo RX. Segundo esses autores, para a classificação radiológica dos pacientes com TB são necessários dois médicos e um radiologista para avaliar o

RX. Nesse estudo a extensão da doença é baseada no número de zonas pulmonares acometidas, sendo considerado que cada pulmão possui três zonas (superior, média e inferior). O envolvimento de uma ou duas zonas é considerado doença localizada, três ou quatro zonas como doença moderada e cinco ou seis zonas, doença extensa. Além disso, LAZZARINI *et al.* (2008) avaliam como TB mais avançada os pacientes que apresentam lesões com cavitação ao RX.

O TT utilizando um derivado protéico purificado (PPD), também conhecido como reação de Mantoux, é mundialmente utilizado como método auxiliar no diagnóstico da TB (BRASIL, 2002a, 2002b, 2005; CASTELO FILHO *et al.*, 2004; CONDE *et al.*, 2009; GUNDOGDU, *et al.*, 2007). O TT baseia-se no fato de que a infecção pelo *M. tuberculosis* produz uma reação de hipersensibilidade tardia ou tipo IV a certos componentes antigênicos do bacilo. Nessa prova, o PPD é injetado intradermicamente. Os linfócitos T sensibilizados pela infecção prévia pelo *Mycobacterium* são recrutados para o local da inoculação e lá liberam linfocinas pró-inflamatórias (TSICOPOULOS *et al.*, 1992). Essas, ao causarem vasodilatação, deposição de fibrina e recrutamento de outras células inflamatórias ao local, induzem eritema e endurecimento do tecido na área da injeção (KAUFMANN, 2004; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004). O pico da reação é atingido 48 a 72 horas depois da injeção, podendo haver vesículas ou necrose no local (BRASIL, 2002a, 2002b, 2005; CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

A interpretação do teste é feita com base no maior diâmetro transversal da área de endurecimento palpável, desprezando-se o eritema sendo que é considerado reator forte quando a medida do maior diâmetro transversal da área de endurecimento tem 10 mm ou mais. Isso pode indicar: vacinação recente com BCG (dois anos); indivíduo infectado pelo bacilo da TB que pode ou não estar doente. (BRASIL, 2002a, 2002b, 2005; CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

Esta classificação somente é válida para pacientes com testes sorológicos anti-HIV negativo. As pessoas infectadas pelo HIV são consideradas co-infectadas pelo bacilo da TB desde que apresentem teste tuberculínico com endurecimento igual ou superior a 5 mm (BRASIL, 2002a, 2002b, 2005; CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

A prova tuberculínica deve ser interpretada de forma especial nas pessoas vacinadas com BCG há menos de dois anos. Outras situações que podem interferir em seu resultado são doenças imunossupressoras como sarcoidose, neoplasias em geral, imunodepressão transitória decorrente de vacinação com vírus vivos, gravidez, tratamento com corticosteróides e outras drogas imunossupressoras, além disso, crianças com menos de dois meses de idade e pessoas com mais de 65 anos de idade podem ter a reatividade ao TT diminuída (BRASIL, 2002a, 2002b, 2005; CASTELO FILHO *et al.*, 2004;). GUNDOGDU *et al* (2007) relatam que repetidas vacinações com BCG e administração freqüente de PPD podem aumentar a reatividade ao TT.

Sob o ponto de vista das defesas do organismo contra a infecção a **Figura 1** resume os principais mecanismos da resposta imunológica ao *M. tuberculosis*. Após a inalação do bacilo, ocorre uma resistência inespecífica do homem contra a instalação das micobactérias, devido, inicialmente, às barreiras físicas como os pelos nasais, à angulação das vias aéreas, o turbilhonamento aéreo, a secreção traqueobrônquica e, o mais importante, o *clearance* mucociliar. Apesar da relativa eficiência desse sistema de defesa e dependendo do número de bacilos inalados, alguns atingem os alvéolos pulmonares e a infecção tuberculosa tem início (BRASIL, 2002a; KRITSKI *et al.*, 2000; NICOD, 2007).

Dessa forma, após a chegada de bacilos nos alvéolos, a resposta imune inata será a primeira a atuar contra o agente invasor. Assim, ocorre a fagocitose do *M. tuberculosis* pelas células fagocitárias, que é uma importante defesa do hospedeiro contra a invasão microbiana. Os macrófagos constituem um componente importante tanto da imunidade inata quanto da imunidade mediada por células. Dentre suas funções principais podemos citar a produção de enzimas proteolíticas e outras substâncias que exibem efeitos microbicidas como os intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, a produção de mediadores solúveis (citocinas) e o processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos T *cluster of differentiation* (CD) CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (BHATT & SALGAME, 2007; LIU *et al.*, 2008; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).

Em modelo animais, as principais moléculas efetoras na defesa antimicobacteriana são os intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (LIU *et al.*, 2008; RAUPACH & KAUFMANN, 2001). Em humanos, estudos sugerem que a produção destes reagentes intermediários pelos macrófagos é muito importante para a defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana (AKAKI *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2008). Wang *et al.* (2001a) observaram que macrófagos alveolares de pacientes com TB pulmonar, expressaram a enzima óxido nítrico *sintetase* (iNOS) e espontaneamente produzem níveis elevados de óxido nítrico (NO) e KUO *et al.* (2000) relatam que a estimulação da produção de NO por monócitos de pacientes com TB parece ter um importante papel auto-regulador na amplificação da síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Dentro da imunidade inata, além dos macrófagos, outros tipos de células têm papel importante na atividade contra os diversos patógenos e na regulação da imunidade adaptativa (BHATT & SALGAME, 2007). As células *natural killer* (NK) também possuem atividade bactericida contra o bacilo. Elas são ativadas na presença de antígenos estranhos e já foram avaliadas no contexto da imunidade contra *M. tuberculosis*, em humanos (BARCELOS *et al.*, 2006). Elas são células efetoras da imunidade inata com histologia, função e mecanismo de ação distinta. Podem exercer funções citotóxicas e secreção de mediadores celulares (BHATT & SALGAME, 2007; COOPER *et al.*, 2001). Esta população celular pode ainda ser classificada como células T naturais killer, referidas na literatura como células NKT, sendo o segundo tipo de célula envolvida na regulação da imunidade inata, e, por expressar a molécula CD3, na sua superfície, são consideradas como linfócitos T. Estas células podem secretar fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), um tipo de citocina pró-inflamatória importante na ativação de macrófagos infectados (JASON *et al.*, 2000), além de exercerem outras funções na eliminação do bacilo. Dieli *et al.* (2003) relatam que células NKT do fígado de camundongos previamente estimulados com BCG, rapidamente produziram interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e tiveram participação na formação do granuloma em resposta a antígenos provenientes da parede celular do *M. tuberculosis*.

Outra subpopulação de células que também participam da imunidade inata é as chamadas linfócitos duplo negativos (DN). Essas células não expressam em sua superfície nem a molécula CD4 e nem CD8. Elas podem expressar o receptor de células T (TCR) do tipo alfa/beta ( $\alpha\beta$ ) ou do tipo gama/delta ( $\gamma\delta$ ). As células DN  $\alpha\beta$  também são conhecidas, por alguns autores, como células NKT inariantes (NKTi) (EXLEY *et al.*, 1997; INOUE *et al.*, 2006; IM *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 2007). Os linfócitos DN  $\gamma\delta$  podem reconhecer antígenos do bacilo através de receptores comuns em células da imunidade inata como receptor do tipo Toll, sendo também capaz de produzir IFN- $\gamma$  e conseqüentemente, ativar macrófagos. Além disso, já foi demonstrado que essas células podem atuar como células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) (BORN *et al.*, 2006, 2007; BRANDES *et al.*, 2005).

Além dessas, a ativação de outras células que participam da imunidade celular específica é muito importante para controle do crescimento microbiano. A imunidade protetora anti-micobacteria envolve principalmente linfócitos T que produzindo citocinas ativam macrófagos e suas funções microbicidas. Isso leva a formação do granuloma que é crucial para conter o bacilo no foco da infecção (BOOM *et al.*, 2003; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).

Em pessoas com imunidade celular intacta, várias linfócitos T ativados e macrófagos são atraídos para o local da infecção, contribuindo para a formação de granulomas que limitam a multiplicação e a disseminação do bacilo pelo organismo (KAUFMANN, 2004; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004). A formação do granuloma pode ser resumida da seguinte forma: a parede do bacilo tem moléculas com propriedades quimiotáticas para os linfócitos T que migram para o local da infecção. Tem início a lesão granulomatosa característica da TB, na qual os linfócitos e os macrófagos ativados tentam conter a disseminação da bactéria. No granuloma maduro, observam-se na região central células epitelióides e células de Langerhans e, em sua periferia, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (REIBMAN *et al.*, 1996). À medida que a imunidade celular se desenvolve, células são destruídas, resultando na formação de um centro caseoso no granuloma cercado por fibroblastos, linfócitos e monócitos oriundos do sangue. O próprio bacilo, com a participação do TNF- $\alpha$  e outros mediadores como IFN- $\gamma$  provenientes de macrófagos ativados, células NK e

linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, são capazes de induzir a necrose de caseificação no centro do granuloma. Nesse meio adverso, os bacilos diminuem sua atividade metabólica, mudando seu metabolismo para catabolismo lipídico e respirando através da via do nitrato. Nesse estado dormente, podem sobreviver por décadas (ALGOOD *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2007). A prova do envolvimento de linfócitos T CD4 na modulação do granuloma reside no fato de que em pacientes com AIDS, frequentemente não se observa a formação do granuloma no foco da infecção e, conseqüentemente, esses pacientes podem desenvolver a TB na forma disseminada que é muito grave. Dessa forma, o granuloma exerce uma importante função ao impedir a disseminação do bacilo em pacientes imunocompetentes (BECK, 2005).

Indivíduos infectados pelo HIV, devido a sua resposta imune prejudicada, apresentam uma susceptibilidade aumentada para TB demonstrando que células T CD4<sup>+</sup> são essenciais para imunidade protetora contra *M. tuberculosis*. Essa susceptibilidade também foi encontrada em estudos em modelo animal (BOOM *et al.*, 2003; CARUSO *et al.*, 1999; CORBETT & DE COCK, 1996; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).

Além da capacidade de produzir citocinas capazes de ativar os fagócitos bem como outras células importantes para resposta imune celular ao bacilo, as células T CD4<sup>+</sup> também possuem funções efetoras de células citotóxicas. Após ativação pelo bacilo *M. tuberculosis*, essas células expressam granzimas, ligante da molécula indutora de apoptose (Fas-L ou CD95L) e produzem granulolisinas e perforinas, que após serem liberadas, levam a lise de células infectadas (CANADAY *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 1997).

Algumas moléculas expressas na superfície de células T têm sido investigadas quanto a participação na ativação dessas células e possivelmente na função efetora das mesmas. A molécula CD28 é uma proteína de membrana que transduz sinais que funcionam conjuntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR para ativação das células T, atuando então como uma molécula co-estimuladora. Os co-estimuladores mais bem definidos para os linfócitos T são constituídos por um par de proteínas relacionadas chamadas de B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são

expressas nas células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Esses co-estimuladores B7 nas APCs são reconhecidos por meio de receptores específicos nas células T. A ligação de moléculas B7 das APCs ao CD28 promove sinais para a célula T que induzem a expressão de proteínas antiapoptóticas e estimulam a produção de fatores de crescimento e de outras citocinas, promovendo ainda a diferenciação e proliferação dessas células T. Assim, a CD28 é o principal receptor co-estimulador para indução de sinais acessórios para a ativação de células T e atuam na regulação da resistência a vários patógenos (ACUTO & MICHEL, 2003). Já a molécula CD69 é uma glicoproteína que é expressa mais precocemente durante o processo de ativação de linfócitos e monócitos durante por exemplo infecção por vírus, bactérias, reconhecimento de células cancerígenas, etc. Ela atua como molécula co-estimuladora para ativação e proliferação de células T (TESTI *et al.*, 1994). A molécula HLA-DR é um antígeno de classe II humano do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), é uma glicoproteína transmembrana expressa primariamente em APC's como linfócitos B, monócitos, macrófagos e células epiteliais do timo. Porém, essa molécula também é expressa em células T ativadas e possui um importante papel na interação celular durante a apresentação de antígenos.

A partir de estudos realizados em modelo murino e em humanos foi possível diferenciar duas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (linfócitos T auxiliares ou helper) denominadas Th<sub>1</sub> (linfócitos T auxiliares tipo I) e Th<sub>2</sub> (linfócitos T auxiliares tipo II), que mediam a proteção ou o agravamento da doença. Essa dicotomia existente entre a resposta imune, protetora ou não, é provavelmente influenciada pelos padrões de citocinas produzidas pelas diferentes subpopulações de linfócitos, durante os estágios iniciais de sobrevivência do patógeno no interior dos macrófagos. (COOPER *et al.*, 1993 ; DLUGOVITZKY *et al.*, 1997; FLYNN *et al.*, 1993 ; JUNG *et al.*, 2002 ; OBERHOLZER *et al.*, 2000).

Linfócitos Th<sub>1</sub> secretam citocinas como IFN- $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2) que aumentam a atividade microbicida dos macrófagos e a expansão de células da imunidade celular (ALGOOD *et al.*, 2003 ; BOOM *et al.*, 2003; DLUGOVITZKY *et al.*, 1997 ; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).

O IFN- $\gamma$  é a principal citocina envolvida na resposta imune protetora contra a infecção causada por micobactérias. Ela é produzida pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e células NK. Essa citocina ativa macrófagos aumentando suas propriedades bactericidas, auxiliando assim na eliminação do bacilo fagocitado. Além disso, também atua como regulador das funções das APC's aumentando a expressão de moléculas de MHC e moléculas co-estimulatórias como CD28 (BOOM *et al.*, 2003; DORMAN *et al.*, 2004; FLYNN *et al.*, 1993; NICOD, 2007; OBERHOLZER *et al.*, 2000).

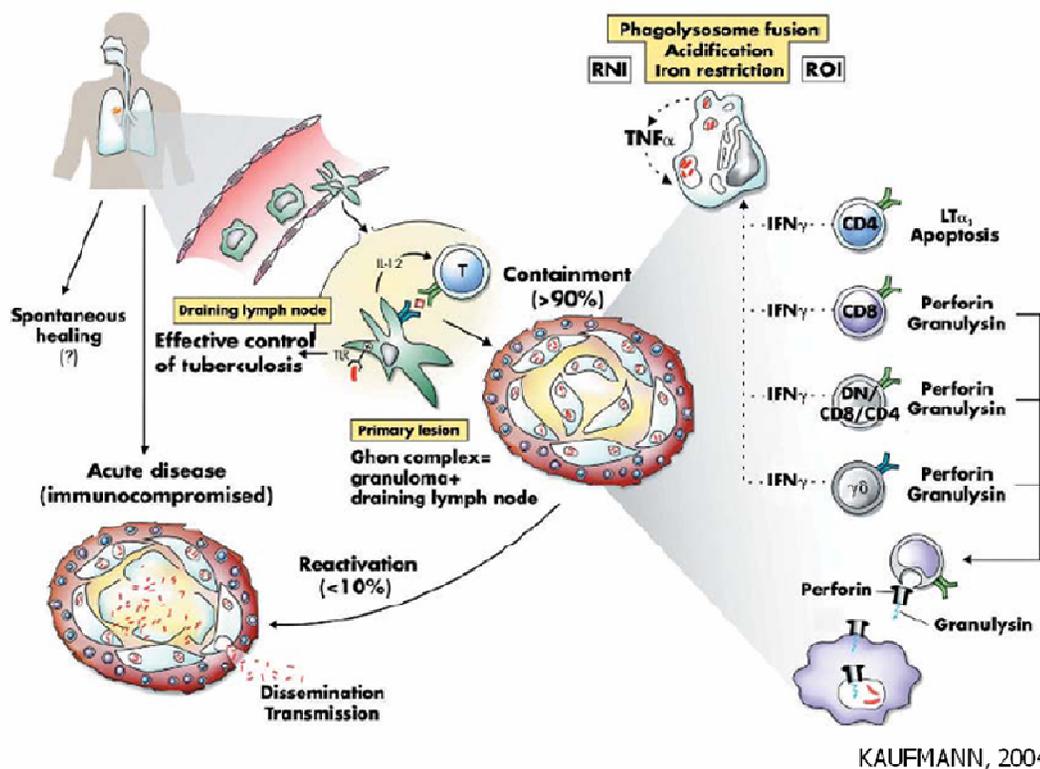
A presença do bacilo induz macrófagos, células dendríticas e, também, linfócitos T a secretarem TNF- $\alpha$ . Nos processos de eliminação da micobactéria, esta citocina também tem uma participação fundamental, principalmente na formação do granuloma capaz de controlar a progressão da doença (LIN *et al.*, 2007; MOHRAN *et al.*, 2001). Além disso, também é muito importante na indução de respostas bactericidas em macrófagos infectados tendo em vista que pacientes que foram tratados por imunoterapia com anti-TNF- $\alpha$ , apresentaram reativação da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, (GARDAM *et al.*, 2003; GULER *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2007; VAN PINXTEREN *et al.*, 2000).

As citocinas do perfil Th<sub>2</sub>, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e fator de crescimento tumoral-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) são consideradas citocinas imunorreguladoras, pois atuam inibindo a produção de citocinas do perfil Th<sub>1</sub>. Estão relacionadas com a estimulação da resposta imune humoral, e parecem favorecer a exacerbação da doença, sendo que o TGF- $\beta$ , também é produzido por macrófagos ativados e interfere também nos mecanismos bactericidas destas células. (DLUGOVITZKY *et al.*, 1997; NICOD, 2007 ; NORTH & JUNG, 2004; OBERHOLZER *et al.*, 2000).

Quando a TB está em atividade, observa-se diminuição da resposta Th<sub>1</sub> e aumento da produção e ação de citocinas supressoras de perfil Th<sub>2</sub> como IL-10 (DLUGOVITZKY *et al.*, 1997; ELLNER, 1996). Esta citocina inibe a proliferação das células e a produção de IFN- $\gamma$ , comprometendo os mecanismos microbicidas dos macrófagos e a apresentação de antígenos, além de ter efeito oposto ao do TNF- $\alpha$ ,

protegendo contra danos teciduais através da regulação da inflamação e da apoptose (ALGOOD *et al.*, 2003; ROJAS *et al.*, 1999).

Outra célula que também participa da resposta imune celular é o linfócito T citotóxico ( $CD8^+$ ). Esses linfócitos liberam granações líticas (granzimas), através de canais de perforina, ativando as caspases e assim eliminando as células infectadas, por indução apoptótica (CANADAY *et al.*, 2001; KAUFMANN, 2002; NICOD, 2007). Além disso, desenvolvem diferentes mecanismos imunorreguladores, dentre os quais se destaca a produção de  $IFN-\gamma$  (CANADAY *et al.*, 1999; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).



**Figura 1** – Infecção, evolução da doença e mecanismos imunes ativados durante a infecção pelo *M. tuberculosis*. IFN – interferon; IL- interleucina; LT – linfocina; RNI – intermediário reativo de nitrogênio; ROI – intermediário reativo de oxigênio; TNF – fator de necrose tumoral; TLR – receptor tipo Toll.

Ainda dentro do contexto da imunidade celular, a pequena subpopulação de linfócitos DN  $\alpha\beta$  foram identificadas no sistema imune periférico de ratos e humanos. Elas compreendem 1-3% da população periférica de células T em humanos

(FISHER *et al* 2005; NIEHUES *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2001). São encontradas principalmente no sangue periférico, timo e pele (GROH *et al*, 1989; LONDEI *et al*, 1989; REIMANN, 1991; STENGER & MODLIN, 1999; TORIBO *et al*, 1988). As células T DN  $\alpha\beta$  reconhecem lípidos e glicolípidos próprios e de patógenos via uma família de glicoproteína semelhante ao MHC-I chamada de CD1, que é uma família de moléculas apresentadoras de antígenos (BECKMAN *et al.*, 1994; GILLERON *et al.*, 2004; INOUE *et al.*, 2006; MATSUNAGA *et al.*, 2004; MOODY *et al.*, 1997, 2000a, 2000b; NIEHUES *et al.*, 1999; PORCELLI *et al.*, 1992;). Esta população de células expressa, em indivíduos saudáveis, moléculas associadas a funções de ativação, memória e citotoxicidade (BROOKS *et al.*, 1993; INOUE *et al.*, 2006; 1993; MONTOYA *et al.*, 2008; NIEHUES *et al.*, 1999).

Alguns estudos apontam um potencial de regulação para os linfócitos DN  $\alpha\beta$  uma vez que demonstram ser capazes de inibir uma variedade de respostas imunes através da supressão da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tanto *in vitro* (CHEN *et al.*, 2003a) quanto *in vivo* (CHEN *et al.*, 2003c, 2005a) e células T CD8<sup>+</sup> (CHEN *et al.*, 2003a, 2003c, 2005a; FORD *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2000). Destaca-se também a tolerância a transplantes, em que essas células regulam a resposta imune a enxertos aumentando sua sobrevivência (CHEN *et al.*, 2003a, 2005a; ZHANG *et al.*, 2000). O mecanismo de lise ou supressão dessas células se dá através interação Fas-FasL (FORD *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* demonstram que a supressão pode também ser mediada através da inibição da produção de IL-2 pelas células T CD4<sup>+</sup> (HAMAD *et al.*, 2003).

Em um estudo utilizando modelo de infecção por *Listeria monocytogenes* foi observado acúmulo de células T com fenótipo DN  $\alpha\beta$  na cavidade peritoneal dos camundongos logo após infecção, sugerindo que essa população celular pode contribuir na proteção inicial da infecção através da secreção de citocinas que induzem acúmulo e ativação de macrófagos como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (KADENA *et al.*, 1997). Além disso, outro estudo demonstrou que células T DN  $\alpha\beta$  também sofrem grande expansão em modelo de infecção murino por citomegalovírus (CMV) (HOSSAIN *et al.*, 2000).

Níveis aumentados de linfócitos DN  $\alpha\beta$  são encontrados em camundongos infectados por *Listeria monocytogenes* e citomegalovírus (HOSSAIN *et al.*, 2000; KADENA *et al.*, 1997). O mesmo ocorre também em humanos durante síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus* e infecção por HIV (CARULLI *et al.*, 2004; MATHIOT *et al.*, 2001; MOREAU *et al.*, 1996).

ANTONELLI *et al.* (2006) demonstraram que as células T DN  $\alpha\beta$  de pacientes com leishmaniose cutânea, possuem um perfil de ativação quando analisadas logo após coleta do sangue sem estímulos antigênicos, e após estimulação *in vitro* produziram citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , demonstrando possuir importante papel na resposta imune contra esse patógeno. Por outro lado COWLEY *et al.* (2005) demonstraram em modelo murino, que essas células são capazes de controlar o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* e *Francisella tularensis in vitro*, apresentando significativa resposta proliferativa e contribuindo para o controle da infecção *in vivo* através de vários mecanismos, incluindo a produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 e possivelmente o desenvolvimento de citotoxicidade.

THOMSEN *et al.* (1995) observaram que células T DN  $\alpha\beta$  humanas apresentam resposta linfoproliferativa positiva, após estímulo *in vitro* com antígenos de várias espécies de *Mycobacterium*. Outros trabalhos também demonstraram que células T DN  $\alpha\beta$  do sangue periférico de pacientes com TB exibem um perfil de ativação através da expressão de moléculas em sua superfície como CD28 e HLA-DR (MONTROYA *et al.*, 2007; NIEHUES *et al.*, 1999), e após estímulo *in vitro* são capazes de produzir citocinas tanto do perfil Th<sub>1</sub> quanto do perfil Th<sub>2</sub> (MONTROYA *et al.*, 2007), são capazes de lisar macrófagos infectados *in vitro* através da interação do ligante FasL nas células T DN  $\alpha\beta$  com a molécula Fas na superfície da célula alvo mas, não são capazes de matar a bactéria intracelular. Segundo STENGER *et al.* (1997) isso poderia sugerir um mecanismo de regulação uma vez que, eliminando células infectadas diminui o estímulo da resposta imune adaptativa e assim a ativação de células T e, conseqüentemente os danos teciduais.

Outra população de células DN são os linfócitos T que expressam TCR composto pelas cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ . Esses linfócitos também estão presentes em baixas

concentrações, variando entre 1 a 5% do total dos linfócitos T circulantes em adultos saudáveis (CARDING & PAUL, 2002; RODEN *et al.*, 2008; VROOM *et al.*, 1991). Porém essas células são encontradas com maior frequência em órgãos como pele, pulmão, intestino e trato geniturinário (CARDING & PAUL, 2002; MOSER & EBERL, 2007; NANNO *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado a participação dos linfócitos  $\gamma\delta$  em doenças autoimunes (KAPP *et al.*, 2004; POGGI *et al.*, 2007), diversos tipos de tumores (CORVAISIER *et al.*, 2005; VIEY *et al.*, 2005; VON LILIENFELD-TOAL *et al.*, 2006; ZOCCHI & POGGI, 2004) e em resposta a vários tipos de infecções, o que poderia indicar uma função protetora dessas células contra diferentes tipos de estímulos e agentes infecciosos (CHEN *et al.*, 2003b).

Os mecanismos para ligação e reconhecimento do antígeno pelas células T  $\gamma\delta$  ainda não estão completamente compreendidos, porém parece que em alguns casos o antígeno pode se ligar diretamente ao TCR desta célula e em outro, necessitam ser apresentados por uma APC (MORITA *et al.*, 2007) podendo ter a participação da molécula CD1 no reconhecimento de alguns antígenos lipídicos (RUSSANO *et al.*, 2006; SPADA *et al.*, 2000). Outros estudos discutem que o reconhecimento de antígenos pelo TCR  $\gamma\delta$  ocorre de forma fundamentalmente diferente do que ocorre nas células T  $\alpha\beta$ . As células  $\gamma\delta$  não requerem o processamento do antígeno e o reconhecimento não é restrito às moléculas do complexo MHC. Portanto, elas são capazes de responder a pequenos peptídeos solúveis e compostos como isopentenil pirofosfato e outros intermediários da via do mevalonato e alquilaminas, compostos não peptídicos ubiquamente encontrados em plantas e bactérias (BUKOWSKI *et al.*, 1999; KABELITZ, 2008; TANAKA *et al.*, 1995), dessa forma são capazes de reconhecer uma infinidade de antígenos presentes em diversos agentes potencialmente prejudiciais ao organismo.

BRANDES *et al.* (2005) demonstraram que células T  $\gamma\delta$  humanas possuem as características principais de APC. Quando ativadas, essas células processam e apresentam os antígenos via MHC e fornecem sinais co-estimulatórios suficientes para indução da proliferação e diferenciação celular de linfócitos T  $\alpha\beta$  *naive in vitro*.

Dessa forma, atuam dentro da imunidade inata e servem como elo entre a imunidade inata e adaptativa. Alguns estudos mostram que linfócitos DN  $\gamma\delta$  da corrente sanguínea, após serem expostas a agentes infecciosos podem ativar outros componentes do sistema imune e desencadear rápida secreção de quimiocinas e citocinas do perfil Th<sub>1</sub> como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estimulando assim as células NK, NKT e facilitando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa de linfócitos T  $\alpha\beta$  específicos (MOSER & EBERL, 2007; WANG *et al.*, 2001b). Além disso, também secretam quimiocinas que atraem leucócitos e fagócitos para o local da infecção (CIPRIANI *et al.*, 2000).

As células T  $\gamma\delta$  também podem destruir células infectadas e bactérias intracelulares através da liberação de granzimas e perforinas (DE LA BARRERA *et al.*, 2003; DIELI *et al.*, 2001; OTTONES *et al.*, 2000) e impedirem assim a disseminação do *M. tuberculosis* pelo organismo via Fas-FasL (DE LA BARRERA *et al.*, 2003) de modo semelhante ao que ocorre em linfócitos T CD8 citotóxicos.

Essas células DN  $\gamma\delta$  circulantes também são importantes para manutenção da integridade do tecido em resposta a infecções e nos processos de cicatrização através da secreção de quimiocinas como fator de crescimento para queratinócitos (KGF) e fator de crescimento para fibroblasto (FGF-9) que induzem a proliferação de células responsáveis pelo reparo tecidual, como células epiteliais, por exemplo, (WORKALEMAHU *et al.*, 2004, 2006). RHODES *et al.* (2001) demonstraram evidências que os linfócitos T  $\gamma\delta$  podem regular a função imune de outros leucócitos devido a produção de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- $\beta$ . Além disso, as células T  $\gamma\delta$  também expressam receptores de células NK como NKG2D (BAUER *et al.*, 1999; DAS *et al.*, 2001; RINCON-OROZCO *et al.*, 2005), podendo então exibir atividade citotóxica contra células infectadas por vírus e células tumorais.

Estudos *in vitro* realizados em primatas demonstraram o desenvolvimento de memória pelas células T  $\gamma\delta$ , evidenciada por uma resposta maior e mais rápida após a segunda exposição ao antígeno (SHEN *et al.*, 2002). Porém, essas células não são capazes de desenvolver memória do tipo antígeno-específica, ou seja, não são capazes de desenvolver uma resposta a apenas um antígeno, como as células T  $\alpha\beta$

de memória. Essas células T  $\gamma\delta$  após exposição a determinado antígeno se transformam em um estado que os pesquisadores designaram de “preparadas” no qual as células expressam marcadores de ativação e algumas moléculas de memória, sendo capazes então de reagir de forma mais exacerbada em uma segunda exposição, porém, essa resposta não é antígeno-específica uma vez que elas não possuem especificidade para os antígenos (JIN *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2002).

Além disso, estudos recentes demonstraram que células T  $\gamma\delta$  humanas ativadas podem auxiliar na resposta imune humoral mediada por linfócitos B. Isto foi evidenciado pela demonstração de moléculas co-estimulatórias importantes para ativação das células B em linfócitos T  $\gamma\delta$ , e em co-culturas *in vitro* com células B tonsilar e células  $\gamma\delta$  (BRANDES *et al.*, 2003; CACCAMO *et al.*, 2006).

Concluindo, os linfócitos  $\gamma\delta$  podem auxiliar na defesa do organismo através da apresentação de antígenos, secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, destruição direta de células infectadas ou transformadas, regulação do processo inflamatório, auxílio na ativação de células B e produção de anticorpos e ainda podem exibir comportamento de células de memória. Dessa forma, elas possuem características inatas e adaptativas muitas vezes sendo consideradas o elo entre os dois tipos de resposta imune.

Dentro do contexto da TB, alguns estudos foram e estão sendo realizados com o intuito de caracterizar a participação dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  na resposta imune contra micobactérias, uma vez que foi demonstrado que essas células expandem *in vitro* após estímulo de antígenos não peptídicos de micobactérias (CONSTANT *et al.*, 1994; KABELITZ *et al.*, 1990; TANAKA *et al.*, 1995). Além disso, pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* podem apresentar número elevado, inalterado ou diminuído de linfócitos DN  $\gamma\delta$  na corrente sanguínea, o que demonstra grande divergência entre os estudos já realizados (AKBULUT *et al.*, 2009; BALBI *et al.*, 1993; BALIKO, 1997; BEHR-PERST *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2002; COROMINAS *et al.*, 2004; DE LA BARRERA *et al.*, 2003; GIOIA *et al.*, 2003; ITO *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1996, LI *et al.*, 1998; UETA *et al.*, 1994; YOSHIDA, 2001)

A atuação da imunidade humoral parece ser pouco relevante na defesa do organismo, os anticorpos podem auxiliar nas fases iniciais da infecção, quando os macrófagos ativados iniciam a fagocitose de bacilos quando se encontram no meio extracelular servindo como opsonina (DE VALLIERE *et al.*, 2005). Além disso, estudos recentes realizados em modelo animal e humano mostram que há um sinergismo e interdependência entre a resposta imune celular e imunidade humoral, sendo assim, apesar de pouco evidente, a resposta humoral seria importante para ativação e manutenção da resposta imune celular sabidamente importante na eliminação dos bacilos (ABEBE & BJUNE , 2009).

Portanto, está claro que existe uma complexa interação entre as células do sistema imunológico e o *M. tuberculosis* e o resultado desta pode-se obter uma resistência ou uma maior susceptibilidade à infecção.

## 2 JUSTIFICATIVA

A TB continua sendo um sério problema de Saúde Pública no mundo. Os avanços no seu conhecimento e a tecnologia disponível para o seu controle não tem sido suficientes para alterar significativamente a sua morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2005).

Entretanto, a despeito da gravidade desta doença, o mecanismo da imunidade protetora contra o *M. tuberculosis* em humanos, ainda não foi completamente elucidado. Numerosos estudos vêm enfatizando o importante papel da imunidade na eliminação da bactéria, sobretudo a imunidade celular responsável pelos principais mecanismos efetores de destruição de macrófagos infectados (BOOM *et al.*, 2003; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).

Alguns estudos apontam a importância dos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  em algumas doenças infectocontagiosas como leishmanioses, malária, hepatites e algumas infecções causadas por bactérias (CARULLI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2003b; DE LA BARRERA *et al.*, 2003; DIELI *et al.*, 2001; HOSSAIN *et al.*, 2000; KADENA *et al.*, 1997; MATHIOT *et al.*, 2001; MOREAU *et al.*, 1996; OTTONES *et al.*, 2000). Porém, apesar dos esforços, muitos estudos ainda são necessários para se conhecer o papel exato dessas células na imunidade contra infecções por micobactérias. Uma melhor caracterização dos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  na TB poderá ser utilizada na padronização de novos parâmetros laboratoriais para avaliação clínica e prognóstica de pacientes infectados, bem como no futuro, o desenvolvimento de novas vacinas e/ou terapias que explorem esse conhecimento ainda pouco compreendido.

Com o intuito de averiguar se as apresentações radiológicas avançadas da TB, bem como as não avançadas, apresentam um perfil de células imunológicas diferenciado, foi realizada uma imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores das diferentes apresentações radiológicas da TB, de modo a identificar qual (ais) célula (s) estariam ativadas e persistentes nesses indivíduos além de

averiguar nesses casos o perfil dos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  e o padrão de citocinas por essas células produzidas.

### 3 OBJETIVO GERAL

Investigar se os pacientes com as apresentações radiológicas não avançadas e avançadas da TB possuem alguma alteração quanto a parâmetros da imunidade celular e quanto ao perfil e padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos DN  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ , quando comparados com o perfil imunológico de indivíduos saudáveis não reatores ao TT.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar através da citometria de fluxo os percentuais dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do sangue periférico de pacientes com TB pulmonar com as apresentações radiológicas não avançadas e avançadas, além de compará-los com os indivíduos saudáveis TT negativos;
- Investigar a expressão de marcadores de ativação nos linfócitos DN  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do sangue periférico de pacientes portadores das apresentações radiológicas não avançadas e avançadas da TB pulmonar, bem como em indivíduos saudáveis TT negativos;
- Investigar a produção de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelos linfócitos DN  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  do sangue periférico de pacientes portadores das apresentações radiológicas não avançadas e avançadas da TB pulmonar e de indivíduos saudáveis TT negativos.

## 4 PACIENTES, MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Normas éticas

Para a elaboração dos protocolos experimentais de acordo com normas éticas em pesquisa médica, foram adotados os princípios da “Declaração de Helsinque” (adotada pela 18<sup>a</sup> Assembléia Mundial de Médicos, Helsinque, Finlândia, 1964, e revista na 29<sup>a</sup> Assembléia Mundial de Médicos em Tóquio, Japão, 1975), contidos no “Código de Ética Médica” do Conselho Federal de Medicina do Brasil (2<sup>a</sup> ed., 1990). Tal declaração foi aceita pelo Conselho Federal de Medicina através da resolução de 30/06/1983.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG –COEP registro n<sup>o</sup> ETIC 095/08 (**Anexo A**).

### 4.2 População

Os participantes deste estudo foram recrutados no Ambulatório de TB da Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais onde os pacientes com diagnóstico de TB pulmonar aceitaram participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo B**), foram entrevistados por pneumologistas que preencheram a ficha clínica (**Anexo C**). O diagnóstico da TB foi estabelecido pelos dados clínicos e laboratoriais.

Todos os indivíduos foram esclarecidos quanto à natureza do estudo e permitiram a coleta de sangue para os testes imunológicos realizados no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFMG e no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitorização, do Centro de Pesquisa René Rachou.

A classificação clínica dos pacientes quanto a apresentação radiológica avançada e não avançada da TB pulmonar foi realizada de acordo com AL-MOAMARY *et al.* (1999) na qual são necessários dois médicos e um radiologista para avaliar o RX. Nesse estudo a extensão da doença é baseada no número de zonas pulmonares acometidas, sendo considerado que cada pulmão possui três zonas (superior, média e inferior). O envolvimento de uma ou duas zonas é considerado doença localizada, três ou quatro zonas como doença moderada e cinco ou seis zonas, doença extensa. Com base nessas informações foi classificados os pacientes que participaram desse estudo em tuberculose pulmonar apresentação radiológica não avançada (TBNAV) e tuberculose pulmonar apresentação radiológica avançada (TBAV). Os pacientes classificados com TBNAV são aqueles que possuem doença localizada ou moderada e os pacientes classificados com TBAV são aqueles que possuem doença extensa e/ou cavitação (LAZZARINI, *et al.* 2008).

Após esses procedimentos, os pacientes foram tratados e acompanhados pelo médico até a completa cura. Todos os pacientes receberam o tratamento de acordo com o esquema recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002a) que se constitui na associação dos antibióticos isoniazida, rifampicina e pirazinamida como medicamentos de primeira linha e a associação com etambutol quando o caso for retratamento.

Como controle para nosso estudo foi utilizado um grupo de indivíduos TT<sup>-</sup> constituídos de voluntários saudáveis, sem sinais clínicos e radiológicos sugestivos de TB, e HIV negativo oriundos do Ambulatório de Tuberculose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O TT com PPD (RT 23 do *Mycobacterium tuberculosis*, 2 UT – Compenhague-Dinamarca), foi administrado no volume de 0,1ml pela técnica de Mantoux (intradérmica) no antebraço esquerdo (TT<sub>1</sub>). Um segundo TT (TT<sub>2</sub>) foi realizado (antebraço direito) após uma semana do TT<sub>1</sub>, para a avaliação do efeito *booster* (incremento de 6 mm **E** >10 mm). A leitura foi feita 72 h após cada teste, medida com régua milimetrada e transparente de 10 cm e o resultado dado em milímetros da maior induração transversa. (ATS, 2000). O TT negativo (TT<sup>-</sup>) em indivíduos saudáveis foi definido com o primeiro TT menor que 10 mm e efeito *booster* negativo.

Assim, neste estudo foram avaliados:

- Grupo de 10 (dez) pacientes sintomáticos com TBNAV analisados antes do tratamento para TB;
- Grupo de 10 (dez) pacientes sintomáticos com TBAV analisados antes do tratamento para TB;
- Grupo de 10 (dez) indivíduos saudáveis, com baciloscopia negativa e radiografia de tórax normal, não reatores ao TT.

#### **4.3 Critérios de inclusão no estudo**

- Indivíduos entre 18 e 65 anos;
- Indivíduos HIV negativo;
- Pacientes com baciloscopia positiva e/ou cultura positiva, além de radiografia de tórax sugestiva;
- Pacientes que não iniciaram o tratamento quimioterápico;
- Indivíduos saudáveis não reatores ao TT com radiografia de tórax normal para compor o grupo controle saudável não reatores ao TT;
- Concordância com a participação no estudo e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (pelo paciente, indivíduo saudável ou responsável legal).

#### **4.4 Critérios de exclusão no estudo**

- Indivíduos HIV positivo;
- Gestantes;
- Pacientes com outros quadros patológicos associados tais como: diabetes, silicose, sarcoidose, linfoma, hepatopatias, imunodeficiência congênita, insuficiência renal crônica, autoimunidade e desnutrição;
- Pacientes que abandonaram o tratamento anteriormente;

- Indivíduos em uso de imunossupressores e corticosteróides;
- Paciente com formas extra pulmonares da TB;
- Recusa em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **4.5 Estudos laboratoriais**

### **4.5.1 Obtenção de amostras de sangue**

Foram coletados 20 mL de sangue periférico com anticoagulante heparina, e 5,0 mL com anticoagulante Acido Etilenodiaminotetraacético sal dissódico (EDTA), diretamente em tubos do sistema “Vacutainer” (Becton-Dickinson), devidamente identificados. Todo material utilizado na coleta era estéril. A amostra de sangue foi coletada antes do início do tratamento quimioterápico nos pacientes com o diagnóstico de TB e nos indivíduos TT<sup>-</sup> que concordaram em participar do trabalho.

### **4.5.2 Testes Imunológicos**

#### **4.5.2.1 Análise imunofenotípica dos linfócitos do sangue periférico (Imunofenotipagem)**

##### 4.5.2.1.1 Anticorpos monoclonais

Para análise imunofenotípica foram utilizados anticorpos monoclonais provenientes das empresas BD Biosciences<sup>®</sup> (**Tabela 1**), que apresentam especificidade para glicoproteínas expressas na superfície leucocitária designadas internacionalmente como CD (CLUSTER OF DIFFERENTIATION). Os anticorpos monoclonais (MoAb)

reagem especificamente com distintos CDs e assim, pode-se ter uma avaliação da expressão dos diferentes marcadores de superfícies leucocitárias ao longo do processo infeccioso provocado pelo *M. tuberculosis* e, conseqüentemente, da funcionalidade efetora do sistema imune dentro desse contexto.

**Tabela 1** - Anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), tricolor (TC) e ficoeritrina (PE) utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e marcadores de ativação.

Anticorpo	Laboratório	Código	Clone
anti-CD4-TC	BD Biosciences	555348	RPAT4
anti-CD8-TC	BD Biosciences	555636	HIT8a
anti- $\gamma\delta$ -FITC	BD Biosciences	559878	MOPC-21
anti- $\alpha\beta$ -FITC	BD Biosciences	555547	G155-228
anti-CD69-PE	BD Biosciences	555531	MOPC-21
anti-CD28-PE	BD Biosciences	555729	CD28.2
anti-HLADR-PE	BD Biosciences	555812	G46-6

#### 4.5.2.1.2 Titulação dos marcadores de superfície celular

A titulação dos marcadores de superfície celular foi realizada empregando sangue total periférico de doadores saudáveis provenientes do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, para se determinar o volume ideal de anticorpos antes de se realizar as análises imunofenotípicas por citometria de fluxo das amostras dos pacientes e do grupo controle.

Assim, foram realizadas titulações utilizando as diluições 1:10, 1:20 e 1:40 dos anticorpos empregados neste estudo.

#### 4.5.2.1.3 Análise “ex vivo” do fenótipo celular dos linfócitos do sangue periférico

Os ensaios de imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico foram feitos segundo protocolo proposto pelo fabricante, modificado conforme descrito a seguir.

Em tubos de poliestireno 22x75mm foram adicionados 10 $\mu$ L da diluição dos anticorpos monoclonais específicos para o marcador de superfície celular de interesse, marcados com fluorocromos, nas seguintes diluições anti CD4-TC 1:20, anti CD8-TC 1:20, anti  $\alpha\beta$ -FITC 1:5, anti  $\delta$ -FITC 1:10, anti CD28-PE 1:40, anti CD 69-PE 1:10 e anti HLA-DR-PE 1:40.

Para cada análise foram utilizados 50 $\mu$ L de sangue periférico total coletado em tubos contendo EDTA. Após homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas por 30 minutos, com os anticorpos adequados, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution – Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (400g, 10 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 2mL de tampão fosfato salino (PBS) (0,015M pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Em seguida, as amostras foram fixadas com 300 $\mu$ L de solução fixadora – MFF (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras foram mantidas a 4 °C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, sendo que o tempo máximo para a coleta dos dados foi sempre inferior a 24h. A análise dos parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados, empregando diferentes estratégias de análises, como descritos nos itens 4.5.2.1.6.

#### 4.5.2.1.4 Obtenção do antígeno do *M. tuberculosis* cepa H37RV

A cepa de referência H37Rv foi adquirida do Laboratório de Micobactérias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta cepa foi repicada em tubos com meio Loweinstein Jensen e incubadas até evidência de crescimento bacteriano (colônias do *M. tuberculosis*) a 37°C. Após crescimento, as colônias foram inativadas a 80°C por 1h e sonicadas em 2 ciclos de 20 segundos a 40 hertz em banho de gelo (ou em amplitude de 36%). Então elas foram esterilizadas através de radiação gama (dose de 5000 Gray por 2h e 15 min). Por fim, dosou-se proteína pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

#### 4.5.2.1.5 Avaliação do padrão de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico após cultura *in vitro*

##### 4.5.2.1.5.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para o isolamento de células mononucleares periféricas foi utilizado 10mL de Histopaque (densidade 1,077g/mL -SIGMA), sobre o qual, foram depositados 20 ml de sangue heparinizado de cada indivíduo, em tubos estéreis de poliestireno de 50 mL. O sistema foi centrifugado a 550g durante 40 minutos a 18°C. O anel de células mononucleares formado na interface Histopaque - plasma foi removido com auxílio de pipeta Pasteur e lavado por três vezes em meio RPMI-1640, através de centrifugação a 370g, durante 7 minutos e a 4°C. As células foram ressuspensas em 1,0 ml de meio RPMI-1640 e contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, acertando-se a concentração para  $1,0 \times 10^7$  cels/mL.

#### 4.5.2.1.5.2 Detecção intracitoplasmática de citocinas (IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ )

Após o ajuste da concentração celular, as células mononucleares foram incubadas em placas de cultivo celular de 24 wells contendo meio de cultura RPMI-1640 com 5% de soro AB humano Rh positivo, na ausência (cultura controle) ou presença de antígeno do bacilo *M. tuberculosis* cepa H37RV na concentração final de 20 $\mu$ g/mL (cultura estimulada). Cada well continha volume final de 800 $\mu$ L com uma concentração celular de  $1,0 \times 10^7$  cels/mL. Além disso, para o controle de funcionalidade celular, através da produção de citocinas, foram empregadas culturas contendo acetato miristato de forbol (PMA) e ionomicina na concentração final de 25ng/mL e 1ng/mL, respectivamente (o PMA e a ionomicina só foram adicionados aos wells após a primeira incubação). As amostras foram incubadas por 48 horas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esta primeira incubação foram adicionados 8 $\mu$ L de brefeldina A na concentração final de 10  $\mu$ g/mL em todos os wells e, também, o PMA e a ionomicina nos wells correspondentes. As amostras foram novamente incubadas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por um período de 4 horas. A utilização da brefeldina A assegura a retenção da citocina no interior celular, uma vez que essa substância as mantém no interior do complexo de Golgi. Após a segunda incubação, 88 $\mu$ L EDTA 20mM (concentração final de 2mM) foram adicionadas diretamente às culturas. Após homogeneização em vortex, as culturas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Este procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente, as células cultivadas foram incubadas em tubos de poliestireno 22x75mm, por 30 minutos, contendo anticorpos monoclonais de superfície anti CD4, CD8,  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ , para identificar as populações de linfócitos de interesse. Em seguida, os eritrócitos foram lisados e os leucócitos fixados com 2mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 400g, por 7 minutos a 4 °C. Posteriormente foram lavadas com 2 mL de PBS-W (PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,5% de albumina sérica bovina-BSA e 0,1% de azida sódica) e permeabilizadas com 3mL de PBS-P (PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos a 4 °C. A suspensão

celular foi centrifugada à 400g, por 7 minutos a 4 °C, e novamente lavada com PBS-W. Posteriormente, 30µL das células permeabilizadas foram adicionadas em tubos de poliestireno 22x75mm contendo 20µL de anticorpo monoclonal anti-citocina marcado com ficoeritrina (PE) a uma diluição de 1:50 em PBS-P (**Tabela 2**) e incubadas por 30 minuto a 4 °C.

**Tabela 2** - Anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina (PE) utilizados para análise da expressão de citocinas intracelular.

Anticorpo	Laboratório	Código	Clone
Anti-TNF- $\alpha$ -PE	BD Biosciences	559321	MAB11
anti-IFN- $\gamma$ -PE	BD Biosciences	559327	B27
anti-IL-10-PE	BD Biosciences	559330	JES3-19F1

Após período de incubação as células foram primeiramente lavadas com 2mL de PBS-P e, em seguida com 2mL de PBS-W. Por fim, foram adicionados 200µL de solução fixadora - MFF (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras foram mantidas a 4 °C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, que não foi superior a 24 horas. A análise dos parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados, empregando diferentes estratégias de análises, como descritos no item 4.5.3.1.6.

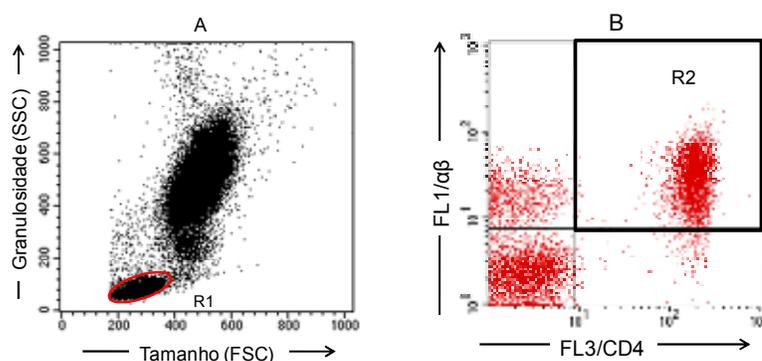
#### 4.5.2.1.6 Estratégia de aquisição dos dados

Os dados obtidos por meio da imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico foram avaliados utilizando diferentes estratégias de análise, dependendo do fenótipo celular avaliado. Assim, empregando os recursos múltiplos do programa CELLQuest™, foram adotadas diferentes estratégias para análise fenotípica, baseadas em quatro definições disponíveis, denominadas aqui: análise convencional

de linfócitos (SATHLER-AVELLAR *et al.*, 2003), análise de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\delta^+CD4^-CD8^-$ , análise de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\delta^+CD4^-CD8^-$  ativadas (HLA-DR, CD69 e CD28) e análise de citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 nos linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\delta^+CD4^-CD8^-$  (ANTONELLI *et al.*, 2006).

#### 4.5.2.1.6.1 Análise convencional de linfócitos

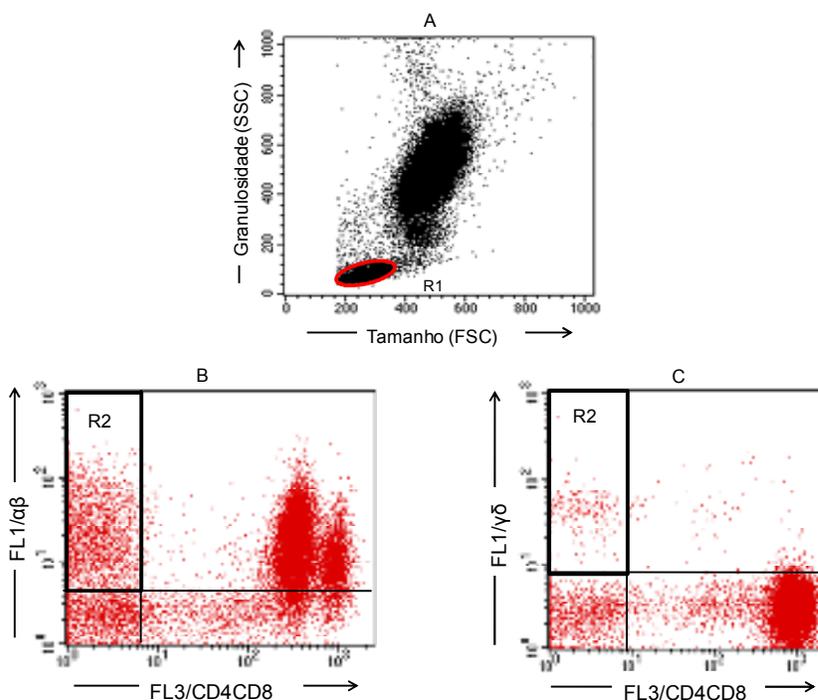
A análise convencional foi feita segundo estratégia proposta por SATHLER-AVELLAR *et al.* (2003). A **Figura 2** ilustra de forma genérica as sequências de passos para os diferentes tipos de análises convencionais. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfológicos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (**Figura 2A**). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, incluindo as modalidades FL1 *versus* FL3 e FL2 *versus* FSC (**Figura 2B**).



**Figura 2** - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/ $\alpha\beta$  *versus* FL3/CD4 e utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas em R1.

#### 4.5.2.1.6.2 Análise de linfócitos $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$ e $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$

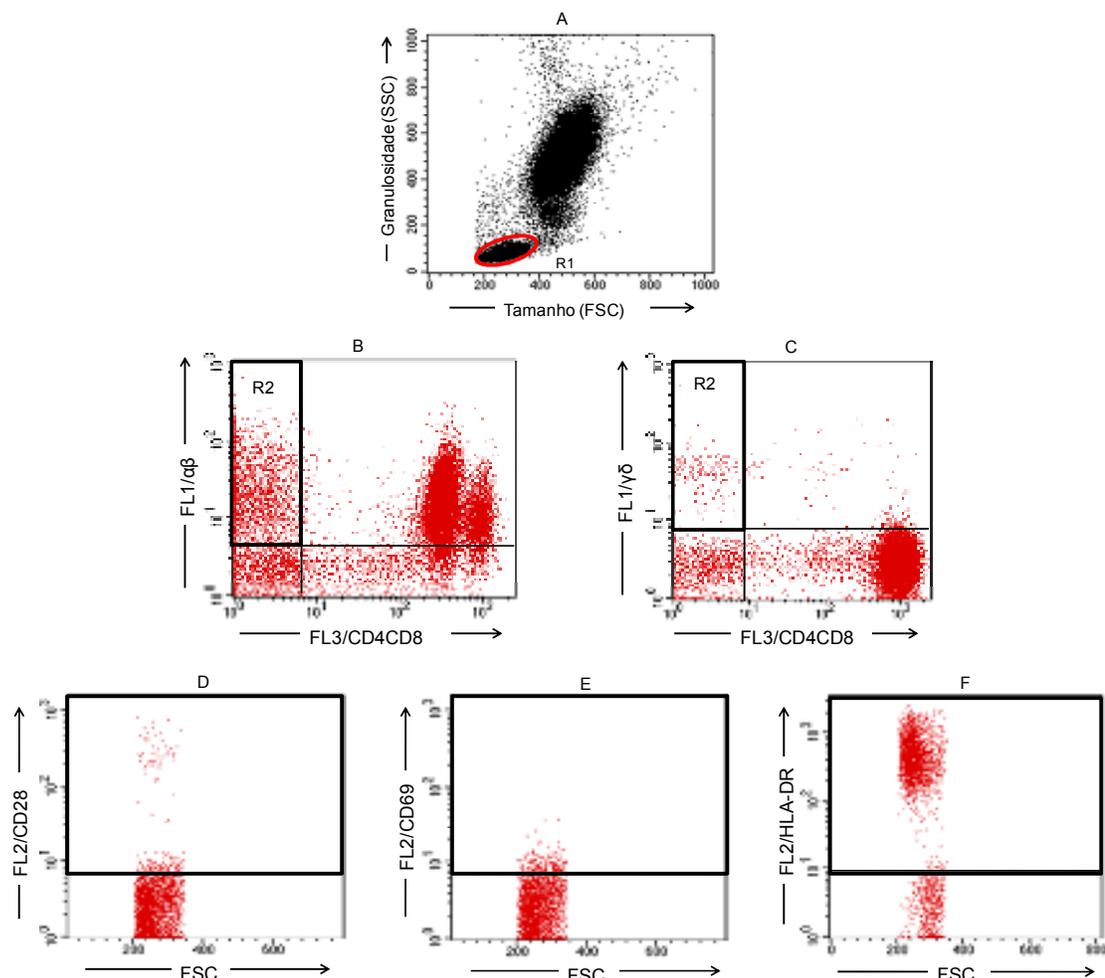
A análise dos linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$  foi realizado segundo ANTONELLI *et al.* (2006). A **Figura 3** ilustra a sequência de procedimentos para a análise de linfócitos DN. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, obtidos através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (**Figura 3A**), foram construídos gráficos de FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\alpha\beta$  (**Figura 3B**) ou FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\gamma\delta$  (**Figura 3C**), onde o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição puntual de fluorescência em R2.



**Figura 3** – Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$  por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\alpha\beta$  utilizado para quantificar o percentual de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  em R2. (C) Gráficos de distribuição puntual FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\gamma\delta$  utilizado para quantificar o percentual de linfócitos  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$  em R2.

#### 4.5.2.1.6.3 Análise da expressão de marcadores de ativação (HLA-DR, CD69 e CD28) em linfócitos $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$ e $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$

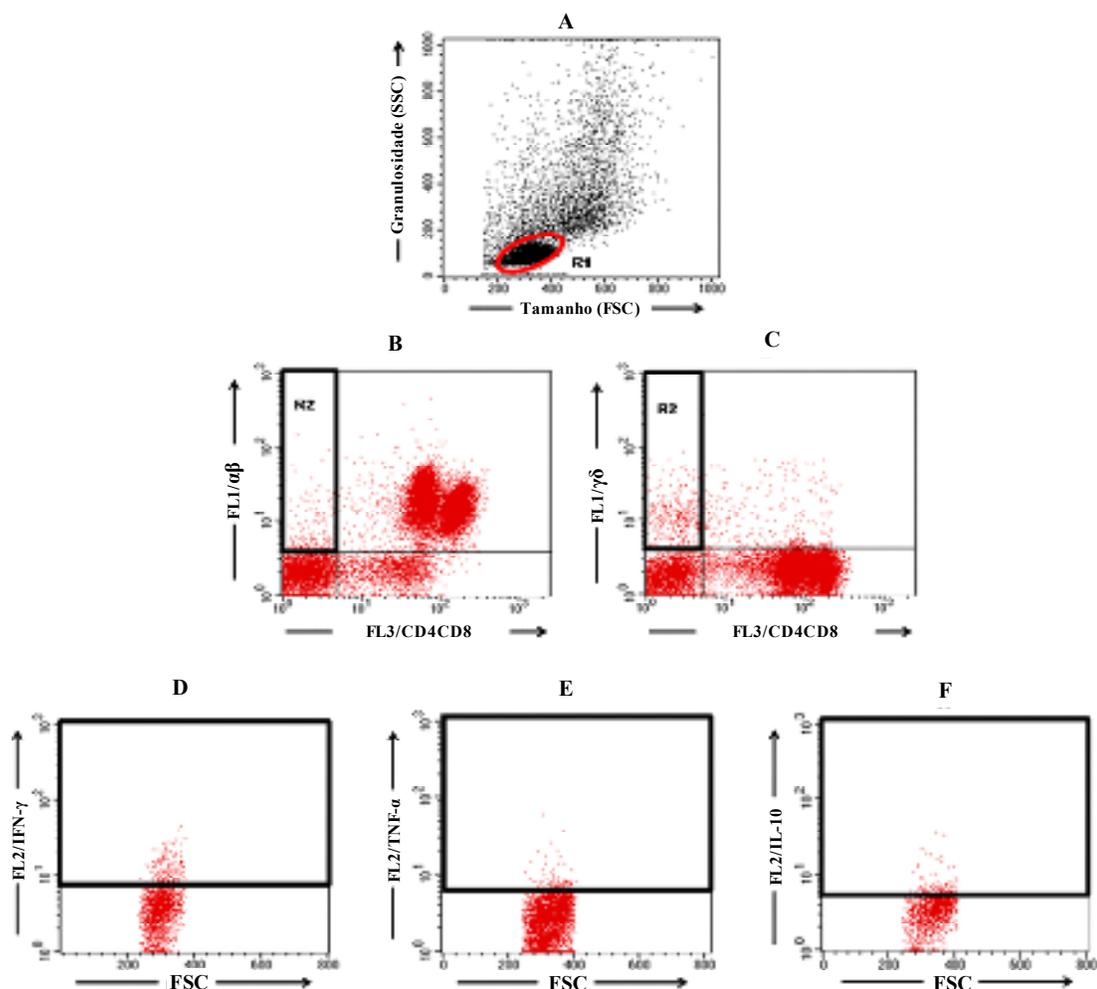
A análise dos linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  ou  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$  ativados (HLA-DR, CD69 e CD28) foi realizado segundo ANTONELLI *et al.* (2006). A **Figura 4** ilustra a sequência de procedimentos para a análise dos linfócitos DN. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, obtidos através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (**Figura 4A**), foram construídos gráficos de FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\alpha\beta$  (**Figura 4B**) ou FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\gamma\delta$  (**Figura 4C**), onde a região (R2) foi delimitada selecionando-se a população  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  ou  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$ . O próximo passo constituiu na combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula “G2 = R1and R2”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Em seguida, gráficos de FSC *versus* FL2/HLA-DR ou CD69 ou CD28, contendo as células confinadas em G2, foram utilizadas para quantificar o percentual de células  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  ou  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$  que expressam os marcadores de ativação HLA-DR, CD69 e CD28 (**Figuras 4D, 4E e 4F**).



**Figura 4** - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$  ativadas (HLA-DR<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup>) por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD4CD8 versus FL1/ $\alpha\beta$  (R2) utilizado para selecionar a população celular  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$ . (C) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD4CD8 versus FL1/ $\gamma\delta$  (R2) utilizado para selecionar a população celular  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$ . (D, E e F) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1and R2”, gráficos de FSC versus FL2/HLA-DR ou CD69 ou CD28, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-HLA-DR^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-CD69^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-CD28^+$  ou  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-HLA-DR^+$ ,  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-CD69^+$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-CD28^+$ .

#### 4.5.2.1.6.4 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$ e $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$

A análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas produzidas pelos linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$  foi feita segundo estratégia proposta por ANTONELLI *et al.* (2006). A **Figura 5** ilustra a sequência de passos para a análise de citocinas citoplasmáticas. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, obtidos através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (**Figura 5A**), foram construídos gráficos de FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\alpha\beta$  e FL3/CD4CD8 *versus* FL1/ $\gamma\delta$  (**Figuras 5B e 5C**), onde a região (R2) foi delimitada selecionando-se as populações  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-$ , respectivamente. Em seguida combinou-se as regiões R1 e R2 através da fórmula “G2 = R1and R2”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Utilizou-se então gráficos de FSC *versus* FL2/ IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, contendo as células confinadas em G2, para quantificar o percentual de subpopulações celulares  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-IFN-\gamma^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-TNF-\alpha^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^-CD8^-IL-10^+$  ou  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-IFN-\gamma^+$ ,  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-TNF-\alpha^+$  e  $\gamma\delta^+CD4^-CD8^-IL-10^+$  (**Figuras 5D, 5E e 5F**).



**Figura 5** - Sequência de procedimentos utilizados para as análises por citometria de fluxo das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 nos linfócitos  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$ . (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B e C) Gráfico de distribuição puntual FL1/ $\alpha\beta$  versus FL3/CD4CD8 (R2) e FL1/ $\gamma\delta$  versus FL3/CD4CD8 (R2) utilizado para selecionar a população celular  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-$ . (D, E e F) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1andR2” gráfico de FSC versus FL2/IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  ou IL-10, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-IFN-\gamma^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-TNF-\alpha^+$ ,  $\alpha\beta^+CD4^+CD8^-IL-10^+$  ou  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-IFN-\gamma^+$ ,  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-TNF-\alpha^+$  e  $\gamma\delta^+CD4^+CD8^-IL-10^+$ .

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida sob orientação do Professor João Paulo Amaral Haddad, do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância, empregando-se o programa estatístico Minitab versão 11.0 (San Diego, USA). As demais análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software GraphPad Prism 5.0. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-wallis, seguido pelo Teste de Dunns para comparação entre três grupos e o Teste Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Já os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste Análise de Variância ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 População estudada

A população estudada foi constituída de 20 pacientes com TB pulmonar comprovada através de exame clínico, baciloscopia e RX de tórax, oriundos do Ambulatório de Tuberculose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os pacientes incluídos neste estudo eram HIV negativos, de ambos os sexos, sendo que na TBNAV 80% eram homens e 20% mulheres e na TBAV 40% eram homens e 60% mulheres. A idade dos pacientes variou entre 18 e 65 anos. A população controle constitui-se de 10 indivíduos saudáveis, ambos os sexos e idade variando entre 22 e 53 anos (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Indivíduos (n), distribuídos por sexo, faixa etária e média de idade nos grupos estudados.

Grupos	Sexo masculino (%)	Sexo feminino (%)	Faixa etária (anos)	Média de idade (anos)
Controles TT	50,0	50,0	22-53	31,9
TBNAV	80,0	20,0	22-64	43,4
TBAV	40,0	60,0	18-65	42,6

TBNAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica não avançada.

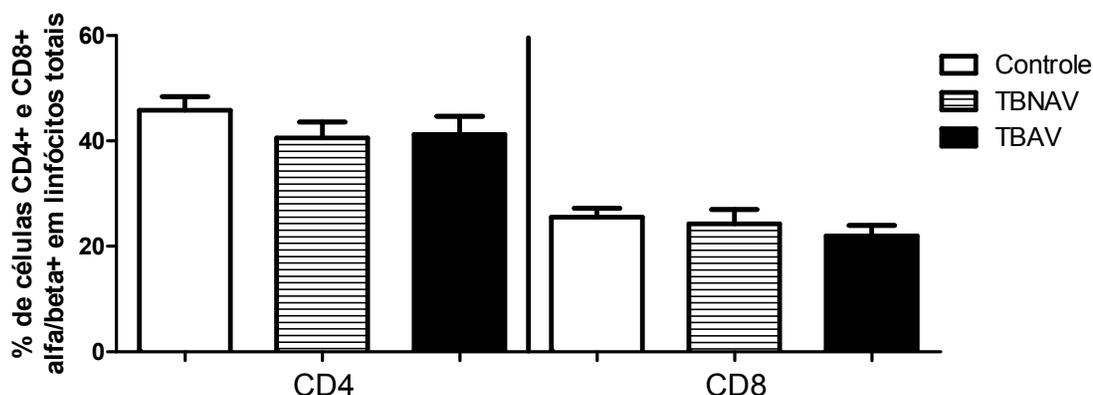
TBAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica avançada.

TT - teste tuberculínico negativo.

## 6.2 Análise “ex-vivo” do fenótipo celular dos leucócitos do sangue periférico

### 6.2.1 Linfócitos $CD4^+ \alpha\beta^+$ e $CD8^+ \alpha\beta^+$

Os resultados do percentual de linfócitos  $CD4^+ \alpha\beta^+$  e  $CD8^+ \alpha\beta^+$  na população de linfócitos totais estão representados na **Figura 6**. De acordo com os resultados apresentados, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos percentuais das células  $CD4^+ \alpha\beta^+$  e  $CD8^+ \alpha\beta^+$  entre o grupo controle e os grupos TBNAV e TBAV (Controle – 45,84%; TBNAV – 40,57%; TBAV – 41,28%) e (Controle – 25,58%; TBNAV – 24,29%; TBAV – 21,97%), respectivamente.



**Figura 6** – Percentual médio de linfócitos  $CD4^+ \alpha\beta^+$  e  $CD8^+ \alpha\beta^+$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

A análise dos percentuais das células  $CD4^+ \alpha\beta^+$  e  $CD8^+ \alpha\beta^+$ , o índice  $CD4^+ \alpha\beta^+ / CD8^+ \alpha\beta^+$ , valor absoluto de leucócitos e de linfócitos dos pacientes TBNAV e TBAV é demonstrado da **Tabela 4**.

**Tabela 4 – Média e desvio padrão dos valores absolutos de leucócitos totais, linfócitos e índices CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> nos grupos estudados.**

Grupos	Indivíduos	Leucócitos totais/mL	Linfócitos /mL	CD4 <sup>+</sup> αβ <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> αβ <sup>+</sup>
Controles TT-	10	6.114 ± 877	1.970 ± 427	1,48 ± 0,76
TBNAV	10	6.563 ± 1414	1.509 ± 451	1,23 ± 1,00
TBAV	10	8.835 ± 3300*	1.042 ± 650*	1,45 ± 0,79

\* Diferença significativa (P<0,05).

Valores de referência - Leucócitos: 3,5 a 10,0 x 10<sup>3</sup>/mL. Linfócitos – 0,9 a 2,9 x 10<sup>3</sup>/mL. Relação CD4/CD8 – 0,98 a 3,24.

TBNAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica não avançada.

TBAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica avançada.

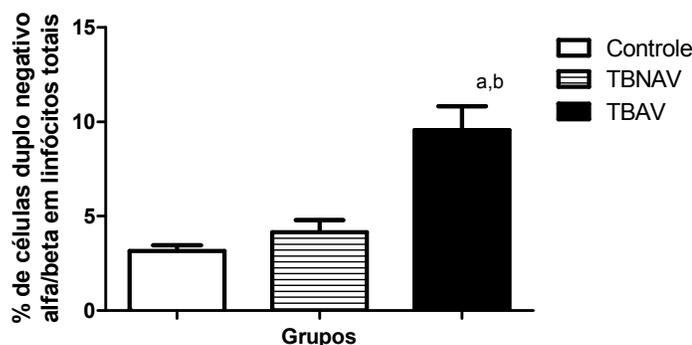
TT - teste tuberculínico negativo.

Os pacientes com TBAV expressam quantidades significativamente maiores (P<0,05) de leucócitos totais que os demais grupos, porém, dentro dos valores de referência. Os linfócitos circulantes dos pacientes TBAV estão diminuídos significativamente (P<0,05) quando comparados com o grupo TBNAV, mas também ainda dentro dos valores de referência. O índice CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> mostra que todas as apresentações radiológicas da TB expressam, como nos indivíduos saudáveis, uma proporção maior de células CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> sem diferença significativa.

### **6.2.2 Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup>**

Os resultados do percentual de linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup> nos pacientes com TB e no grupo de indivíduos saudáveis TT<sup>-</sup> estão representados na **Figura 7**.

A análise entre os grupos estudados mostra que os pacientes com TBAV expressam um percentual significativamente maior (P<0,05) destas células na corrente sanguínea que pacientes com TBNAV e o grupo controle. Por outro lado, a análise dos grupos TBNAV e controle não mostraram diferença significativa entre os grupos (P>0,05). (TBNAV – 4,15%; TBAV – 9,56%; Controle – 3,16%).

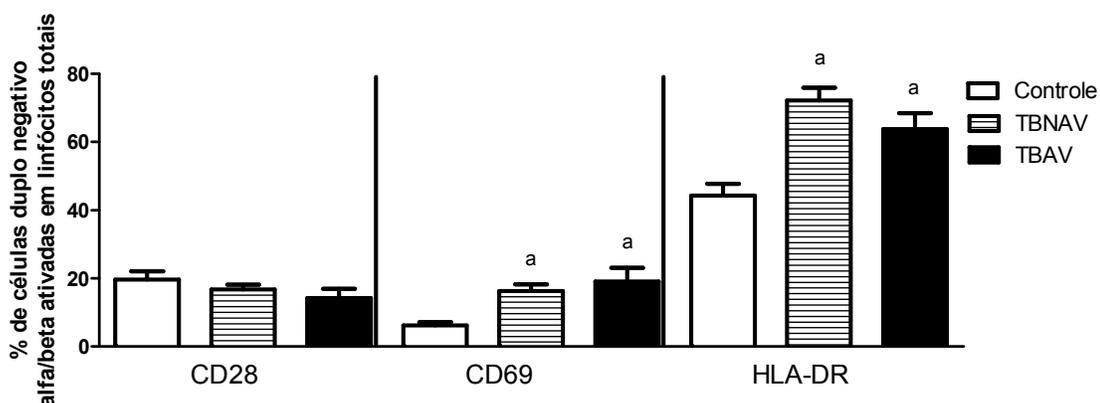


**Figura 7** – Percentual médio de linfócitos  $CD4^+CD8^+\alpha\beta^-$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controle saudáveis TT. As diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

### 6.2.3 Linfócitos $CD4^+CD8^+\alpha\beta^+CD28^+$ , $CD4^+CD8^+\alpha\beta^+CD69^+$ e $CD4^+CD8^+\alpha\beta^+HLA-DR^+$

Os resultados do percentual de linfócitos  $CD4^+CD8^+\alpha\beta^+CD28^+$  na população de linfócitos totais de pacientes com TB e do grupo de indivíduos saudáveis TT estão representados na **Figura 8**. A análise dos resultados mostrou que não houve diferença significativa entre o grupo TBNAV, TBAV e controle (TBNAV – 16,71%; TBAV – 14,27%; Controle – 19,61%).

A análise da expressão dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR não mostrou diferença significativa entre os grupos TBNAV e TBAV, porém ambos os grupos apresentaram percentual significativamente maior de linfócitos  $CD4^+CD8^+\alpha\beta^+CD69^+$  e  $CD4^+CD8^+\alpha\beta^+HLA-DR^+$  circulantes ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (TBNAV – 16,33%; TBAV – 19,01%; Controle – 6,26%) e (TBNAV – 72,14%; TBAV – 63,82%; Controle – 44,27%), respectivamente (**Figura 8**).

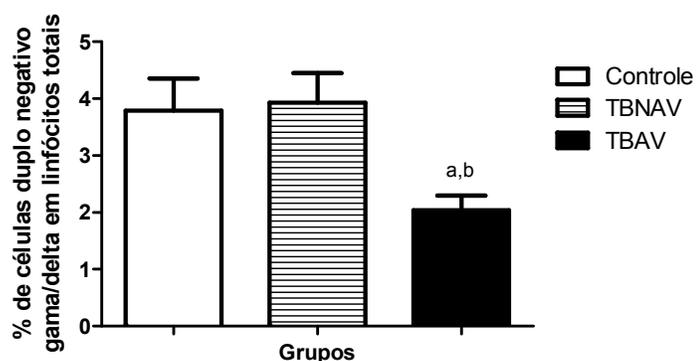


**Figura 8** – Percentual médio de linfócitos  $CD4^+CD8^-\alpha\beta^+CD28^+$ ,  $CD4^+CD8^-\alpha\beta^+CD69^+$  e  $CD4^+CD8^-\alpha\beta^+HLA-DR^+$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e controles saudáveis indivíduos TT. As diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

Os linfócitos  $CD4^+CD8^-\alpha\beta^+$  do sangue circulante dos pacientes com as diferentes apresentações radiológicas da TB apresentaram um perfil ativado demonstrado através da expressão de CD69 e HLA-DR quando comparados com o grupo controle. Porém, esse perfil de ativação não difere entre os pacientes TBNAV e TBAV.

#### **6.2.4 Linfócitos $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+$**

Os resultados do percentual de linfócitos  $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+$  de pacientes com TB pulmonar e no grupo de indivíduos saudáveis TT estão representados na **Figura 9**. A análise dos resultados mostra que os pacientes TBAV expressam um percentual significativamente menor ( $P < 0,05$ ) destas células na corrente sanguínea que pacientes com TBNAV e o grupo controle. A análise dos grupos TBNAV e controle não mostraram diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ). (TBNAV – 3,93%; TBAV – 2,03%; Controle – 3,79%).



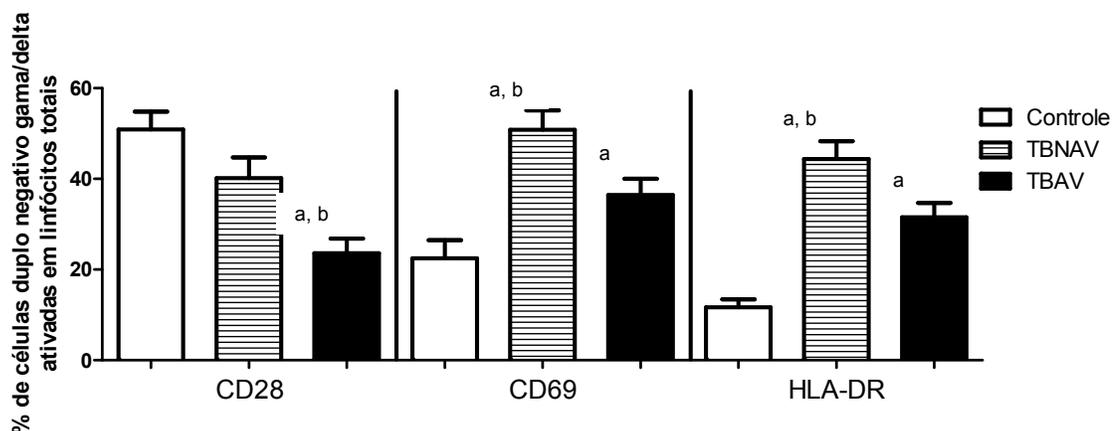
**Figura 9** – Percentual médio de linfócitos  $CD4^+CD8^-γδ^-$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas ( $P<0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

### 6.2.5 Linfócitos $CD4^+CD8^-γδ^+CD28^+$ , $CD4^+CD8^-γδ^+CD69^+$ e $CD4^+CD8^-γδ^+HLA-DR^+$

Os resultados do percentual de linfócitos  $CD4^+CD8^-γδ^+CD28^+$ ,  $CD4^+CD8^-γδ^+CD69^+$  e  $CD4^+CD8^-γδ^+HLA-DR^+$  nos pacientes com TB pulmonar e no grupo de indivíduos saudáveis TT estão representados na **Figura 10**. A análise dos resultados entre os grupos TBNAV e TBAV mostraram que os pacientes TBAV expressam um percentual significativamente menor ( $P<0,05$ ) de linfócitos  $CD4^+CD8^-γδ^+CD28^+$  na corrente sanguínea que pacientes TBNAV e o grupo controle. Por outro lado, a análises dos grupos TBNAV e controle não mostraram diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ). (TBNAV – 40,19%; TBAV – 23,58%; Controle – 50,88%).

A análise dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR mostraram que os pacientes com TB independentemente da apresentação radiológica apresentada mostraram um percentual maior dessas moléculas em relação ao grupo controle. Além disso, observamos que os pacientes com TBNAV expressam um percentual significativamente maior ( $P<0,05$ ) dos marcadores CD69 e HLA-DR que pacientes

TBAV (TBAV – 50,80%; TBAV – 36,42%; Controle – 22,41%) e (TBAV – 44,40%; TBAV – 31,50%; Controle – 11,61%), respectivamente (**Figura 10**).



**Figura 10** – Percentual médio de linfócitos  $CD4^+CD8^- \gamma\delta^+$   $CD28^+$ ,  $CD4^+CD8^- \gamma\delta^+$   $CD69^+$  e  $CD4^+CD8^- \gamma\delta^+$   $HLA-DR^+$  circulantes no sangue periférico de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle: indivíduos TT (n=10); TBNAV: TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV: TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

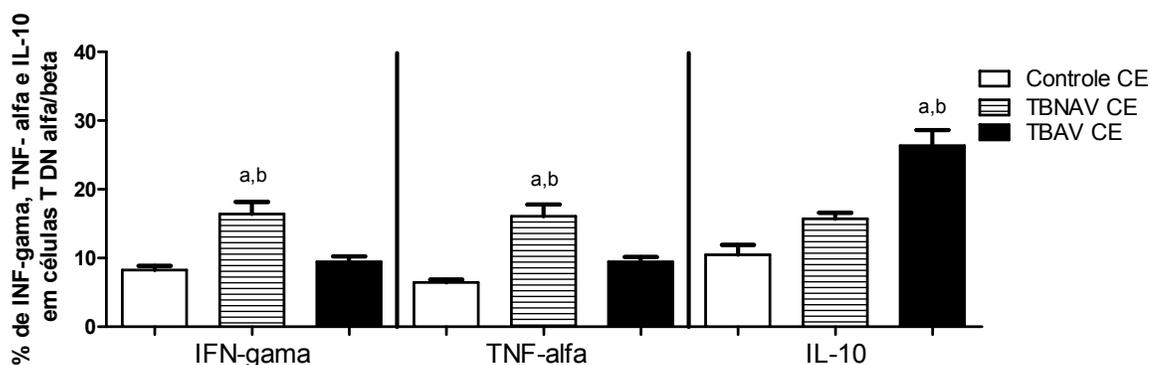
Dessa forma, observamos que os linfócitos  $CD4^+CD8^- \gamma\delta^+$  da corrente sanguínea de pacientes com TB pulmonar se apresentam ativados e que esse perfil é diferenciado quando comparamos as diferentes apresentações radiológicas da TB. Os pacientes com a apresentação radiológica não avançada da TB expressam níveis maiores de ativadas que os pacientes com a apresentação radiológica avançada da doença (**Figura 10**).

### 6.3 Avaliação do padrão de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico após cultura *in vitro*

#### **6.3.1 Expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 em Linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta$ <sup>+</sup>**

A análise da expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 em linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta$ <sup>+</sup> nas CC revelaram que não houve diferença significativa nos grupos analisados (Controle – 5,16%; TBNAV – 5,91%; TBAV – 5,38%), (Controle – 4,63%; TBNAV – 5,26%; TBAV – 4,98%) e (Controle – 6,02%; TBNAV – 4,92%; TBAV – 7,38%), respectivamente. A análise dos dados das CE com antígeno revelou que o grupo TBNAV apresentou percentual de expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que o grupo de pacientes TBAV e o grupo controle. Porém, o grupo TBAV não apresentou diferença significativa com relação aos percentuais de expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando comparado com o grupo controle (TBNAV – 16,42%; TBAV – 9,50% Controle – 8,26%) e (TBNAV – 16,08%; TBAV – 9,49% Controle – 6,47%) respectivamente (**Figura 11**).

De forma contrária ao que observamos na análise da expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , a expressão de IL-10 pelos linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta$ <sup>+</sup> oriundas das CE mostraram uma expressão significativamente aumentada ( $P < 0,05$ ) dessa citocina pelo grupo TBAV quando comparados com os indivíduos TBNAV e com o grupo controle. Porém, o grupo TBNAV não apresentou diferença significativa na expressão de IL-10 quando comparado com o grupo controle (TBNAV – 15,71%; TBAV – 26,37% Controle – 10,49%) (**Figura 11**).



**Figura 11** – Percentual médio de linfócitos  $CD4^+CD8^+αβ^+IFN-γ^+$ ,  $CD4^+CD8^+αβ^+TNF-α^+$  e  $CD4^+CD8^+αβ^+IL-10^+$  após cultura de PBMC por 48 horas em meio RPMI-1640 na presença de antígeno do bacilo *M. tuberculosis* cepa H37-Rv (cultura estimulada - CE) de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas ( $P<0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle CE: cultura estimulada de indivíduos TT (n=10); TBNAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

Dessa forma, os linfócitos  $CD4^+CD8^+αβ^+$  expressam, nos pacientes com TBNAV maiores níveis de IFN- $γ$  e TNF- $α$  enquanto que nos pacientes com TBAV essas células expressam níveis aumentados da citocina regulatória IL-10.

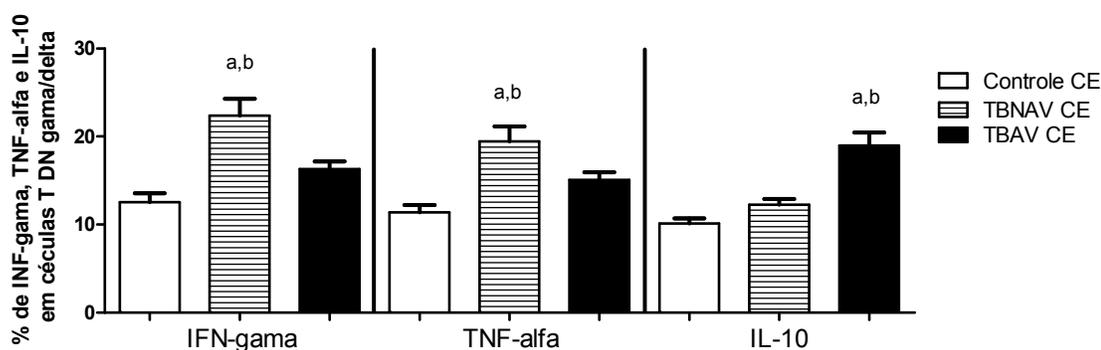
### **6.3.2 Expressão de IFN- $γ$ , TNF- $α$ e IL-10 em Linfócitos $CD4^+CD8^+γδ^+$**

Assim como para os linfócitos  $CD4^+CD8^+αβ^+$  a análise da expressão de IFN- $γ$ , TNF- $α$  e IL-10 nos linfócitos  $CD4^+CD8^+γδ^+$  após CC revelou que não houve diferença significativa nos grupos analisados (Controle – 8,46%; TB – 9,34%; TBNAV – 9,20%; TBAV – 9,47%), (Controle – 8,70%; TB – 9,06%; TBNAV – 8,34%; TBAV – 9,77%) e (Controle – 7,73%; TB – 7,50%; TBNAV – 7,25%; TBAV – 7,75%), respectivamente.

Nos linfócitos  $CD4^+CD8^+αβ^+$ , a análise dos dados das CE com antígeno revelou que o grupo de TBNAV apresentou percentual de expressão de IFN- $γ$  e TNF- $α$  significativamente maior ( $P>0,05$ ) quando comparado com grupo de pacientes TBAV

e controle. Porém, o grupo TBAV não possui diferença significativa com relação aos percentuais de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando comparado com o grupo controle (TBNAV – 22,40%; TBAV – 16,32% Controle – 12,56%) e (TBNAV – 19,44%; TBAV – 15,06%; Controle – 11,38%), respectivamente (**Figura 12**).

Já a expressão de IL-10 pelos linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\gamma\delta^+$  oriundas das CE mostraram uma expressão significativamente aumentada ( $P < 0,05$ ) dessa citocina pelo grupo TBAV quando comparados com TBNAV e com o grupo controle. Porém, o grupo TBNAV não apresentou diferença significativa com relação aos percentuais de IL-10 quando comparado com o grupo controle (TBNAV – 12,26%; TBAV – 18,97% Controle – 10,11%) (**Figura 12**).



**Figura 12** – Percentual médio de linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\gamma\delta^+$ IFN- $\gamma^+$ , CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\gamma\delta^+$ TNF- $\alpha^+$  e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\gamma\delta^+$ IL-10<sup>+</sup> após cultura de PBMC por 48 horas em meio RPMI-1640 na presença de antígeno do bacilo *M. tuberculosis* cepa H37-Rv (cultura estimulada - CE) de indivíduos com TBNAV, TBAV e indivíduos controles saudáveis TT. As diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo controle e “b” entre os grupos TBNAV e TBAV. As barras horizontais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. Controle CE: cultura estimulada de indivíduos TT (n=10); TBNAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar na apresentação radiológica não avançada (n=10); TBAV CE: cultura estimulada de indivíduos com TB pulmonar apresentação radiológica avançada (n=10).

Dessa forma, os linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\gamma\delta^+$  assim como os linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta^+$  expressam, nos pacientes TBNAV, maiores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  enquanto que nos pacientes TBAV essas células expressam níveis aumentados da citocina imunorregulatória IL-10. Porém os linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\gamma\delta^+$  produzem níveis significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  na TBNAV (22,40)% que os linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta^+$  (16,42%). Por outro lado, os linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta^+$  expressam, nos

pacientes TBAV, níveis significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) de IL-10 (26,37%) que os linfócitos  $CD4^-CD8^-γδ^+$  (18,97%).

#### 6.4 Síntese dos resultados

A **Tabela 5** nos mostra um sumário com todos os resultados obtidos neste estudo após a avaliação “ex-vivo” e a cultura *in vitro*. Observa-se menor expressão de linfócitos DN  $γδ$  e maior expressão de linfócitos DN  $αβ$  na apresentação radiológica TBAV que nos TBNAV. A expressão da molécula co-estimuladora CD28 e dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR é aumentado nos linfócitos DN  $γδ$  dos pacientes com TBNAV o que demonstra um perfil de prévia ativação dessas células nessa apresentação radiológica da doença. Quanto à citocinas produzidas após estimulação antigênica, observamos que ambas as células produzem mais citocinas inflamatórias IFN- $γ$  e TNF- $α$  na TBNAV enquanto que produzem maiores níveis de citocina imunorregulatória IL-10 na TBAV. Além disso, os resultados mostram que os linfócitos DN  $γδ$  são melhores produtoras de IFN- $γ$  enquanto que os linfócitos DN  $αβ$  são melhores produtoras de IL-10.

**Tabela 5 – Frequência (%) da expressão de marcadores de ativação após estudo “ex-vivo” e produção de citocinas *in vitro* dos linfócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>γδ<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com TBNAV e TBAV.**

	TBNAV		TBAV	
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> αβ <sup>+</sup> %	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> γδ <sup>+</sup> %	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> αβ <sup>+</sup> %	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> γδ <sup>+</sup> %
% Total	3,16	3,93 <sup>a</sup>	9,56 <sup>a,b</sup>	2,04
CD28	16,71	40,19 <sup>a,b</sup>	14,27	23,48 <sup>b</sup>
CD69	16,33	50,80 <sup>a,b</sup>	19,01	36,42 <sup>b</sup>
HLA-DR	72,14	44,40 <sup>a,b</sup>	63,82 <sup>b</sup>	31,50
IFN-γ	16,42 <sup>a</sup>	22,40 <sup>a,b</sup>	9,50	16,32 <sup>b</sup>
TNF-α	16,08 <sup>a</sup>	19,44 <sup>a</sup>	9,49	15,06 <sup>b</sup>
IL-10	15,71	12,26	26,37 <sup>a,b</sup>	18,97 <sup>a</sup>

a – Diferença significativa (P<0,05) entre TBNAV e TBAV analisada dentro da mesma população celular.

b – Diferença significativa (P<0,05) entre os linfócitos CD4-CD8-αβ+ e CD4-CD8-γδ+ analisada dentro do mesmo grupo.

TBNAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica não avançada.

TBAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica avançada.

Com base nos dados obtidos na análise dos diversos parâmetros fenotípicos empregados nesse estudo, apresentamos uma figura esquemática dos resultados significativos obtidos nesse trabalho. Essa abordagem visou organizar os dados permitindo a identificação de alterações “intrínsecas” nas diferentes apresentações radiológicas da TB.

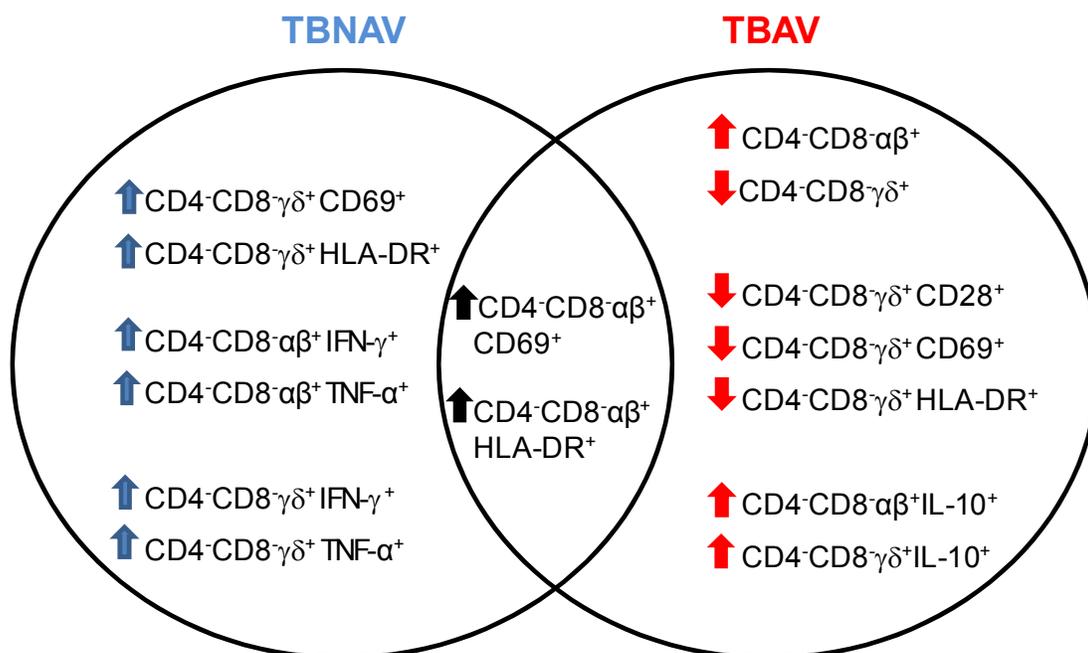
A análise das informações contidas na **Figura 13** permitiu observarmos que a elevação de linfócitos DN αβ ativadas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>αβ<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) (**Figura 8**) são fatores relacionados à infecção pelo bacilo da TB, podendo ser identificados na interseção entre TBNAV e TBAV, portanto, não diferindo entre essas duas apresentações radiológicas da doença.

Quanto às alterações celulares específicas de um determinado grupo clínico, observamos um grande número de alterações em ambos os grupos.

Nesse contexto, dentre as características exclusivas do grupo TBNAV, observamos no compartimento de linfócitos circulantes uma elevação dos linfócitos DN γδ

ativadas ( $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+ CD69^+$  e  $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+ HLA-DR^+$ ) (**Figura 10**). Além dessas, observou-se um aumento da expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por ambas as células (**Figuras 11 e 12**).

Específicas do grupo TBAV destacam-se o aumento da subpopulação DN  $\alpha\beta$  com paralela diminuição dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  (**Figuras 7 e 9**). Ao contrário do que observamos para o grupo TBNAV, no grupo TBAV observamos diminuição dos percentuais dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  ativadas ( $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+ CD28^+$ ,  $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+ CD69^+$  e  $CD4^+CD8^-\gamma\delta^+ HLA-DR^+$ ) (**Figura 10**) e uma maior produção de citocina IL-10 por ambas as células (**Figuras 11 e 12**). Assim, a diminuição dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  e do seu estado de ativação paralela com aumento dos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e a produção de elevados níveis de IL-10 por essas células estão associados com apresentação radiológica mais avançada da TB.



**Figura 13** – Análise das alterações encontradas no perfil fenotípico após “estudo ex-vivo” e da produção de citocinas *in vitro* pelos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  dos pacientes portadores das diferentes apresentações radiológicas da TB. A orientação das setas representa elevação ou diminuição estatisticamente significativa de um dos parâmetros com relação ao grupo controle e a outra apresentação radiológica da TB. TBNAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica não avançada. TBAV – tuberculose pulmonar apresentação radiológica avançada.

## 7 DISCUSSÃO

A OMS determina a necessidade dos países adotarem procedimentos severos de contenção das doenças epidêmicas, como é o caso da TB, uma vez que se observa, atualmente, uma tendência do ressurgimento e expansão de várias doenças negligenciadas que sempre afligiram a humanidade. Estima-se em mais de 50 milhões o número de brasileiros infectados com o *M. tuberculosis* sendo que no Brasil, em 2008, foram notificados 53.144 novos casos de TB, sendo que destes, 4.774 somente no estado de Minas Gerais, colocando-o na quarta posição entre os estados com maiores números de casos no país (WHO, 2008).

A resposta imune protetora na TB está relacionada com a imunidade inata e com a imunidade mediada por células, envolvendo interações entre linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e outras subpopulações como DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ , além de células da linhagem monocítica (BHATT & SALGAME, 2007; LIU *et al.*, 2008; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004). Dessa forma, estudos que avaliam os mecanismos imunológicos associados a manifestações da TB têm sugerido eventos multifatoriais e/ou a combinação de parâmetros imunológicos, suportando à hipótese de que mecanismos complexos estão envolvidos na indução e/ou regulação da patogenia desta doença. Contudo, estudos adicionais fazem-se ainda necessários para a compreensão da dinâmica desse processo. O estudo da participação de diferentes populações celulares nos eventos protetores e/ou patológicos da doença chama a atenção para o envolvimento principalmente da resposta imune celular. Nesse contexto, a detecção de moléculas expressas na superfície de células tem permitido um grande avanço na pesquisa científica aplicada ao estudo de doenças infecciosas humanas possibilitando a identificação e/ou caracterização de novas subpopulações, oferecendo assim, informações adicionais que podem enriquecer os conhecimentos acerca da imunidade contra a TB.

Neste estudo a caracterização imunofenotípica dos linfócitos bem como a determinação de sua ativação e perfil de citocinas produzidas após estímulo antigênico *in vitro* teve como objetivo delinear alguns aspectos da resposta imune

celular que pode estar atuando na TB bem como elucidar possíveis indicadores imunológicos capazes de diferenciar as apresentações radiológicas TBNAV e TBAV servindo como importante ferramenta de diagnóstico e prognóstico.

O presente trabalho foi realizado com 20 pacientes que apresentaram diagnósticos comprovados de TB (10 TBNAV e os outros 10 TBAV). A análise dos dados coletados mostrou uma homogeneidade entre os grupos estudados. A média de idade dos pacientes TBNAV e TBAV foram muito próximas (43,4 e 42,6 anos, respectivamente), e a faixa etária entre (22-64 e 18-65 anos, respectivamente), não apresentando diferença significativa. O mesmo foi obtido no grupo controle (**Tabela 3**).

Para uma melhor elucidação da atuação dos diferentes fenótipos celulares que podem ser expressos na superfície celular durante a infecção pelo *M. tuberculosis* foi avaliado inicialmente a participação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, pela expressão dos marcadores celulares CD4, CD8 e  $\alpha\beta$ , nos grupos estudados. A importância desta avaliação é evidenciada pelos diversos relatos a cerca da atuação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> frente à infecção provocada pelo *M. tuberculosis* (BHATT & SALGAME, 2007; LIU *et al.*, 2008; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004).

As células T CD4<sup>+</sup> após ativação pelos antígenos do bacilo produzem várias citocinas importantes no processo destruição da bactéria, além destas células também exibirem funções efetoras de células citotóxicas (CANADAY *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 1997). As células CD8<sup>+</sup> liberam grânulas líticas (granzimas), através de canais de perforina, ativando as caspases e assim eliminando as células infectadas, por indução apoptótica, além de também produzirem citocinas (CANADAY *et al.*, 2001; KAUFMANN, 2002; NICOD, 2007).

Em concordância com os resultados obtidos por BARCELOS *et al.* (2005) a avaliação das células T CD4<sup>+</sup> em pacientes com TB pulmonar não mostrou diferença nos percentuais dessas células entre os grupos TBNAV, TBAV e controle e observou-se um predomínio principalmente de células T CD4<sup>+</sup> em relação as células T CD8<sup>+</sup> (**Figura 6**), o que também está de acordo com diversos estudos que

apontam a imunidade celular, principalmente as células T CD4<sup>+</sup>, como responsáveis pelo controle da infecção pelo *M. tuberculosis* (BOOM *et al.*, 2003; CARUSO *et al.*, 1999; CORBETT & DE COCK, 1996; NICOD, 2007; NORTH & JUNG, 2004). Além disso, estudos em camundongos e em humanos têm sugerido que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem desempenhar um papel importante tanto na imunidade celular quanto nas funções de ativação dos macrófagos infectados (CANADAY *et al.*, 2001; SCHLUGER, 2001; TAN *et al.*, 1997).

LAZAREVIC & FLYNN (2002) e RODRIGUES *et al.* (2002) relatam que linfócitos T CD4<sup>+</sup> regulam a capacidade dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> de exercerem sua atividade citotóxica em camundongos e em humanos, bem como para o desenvolvimento de células de memória (SERBINA & FLYNN, 2001). Em nosso estudo não observamos diferença nos níveis de células CD8<sup>+</sup> entre os grupos estudados (**Figura 6**). Esses resultados foram similares aos encontrados por BARCELOS *et al.* (2005). Estudos realizados por RODRIGUES *et al.* (2002) demonstraram uma redução de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em indivíduos com TB, devido, provavelmente, a uma diminuição da capacidade de resposta do sistema imunológico ao *M. tuberculosis*. Possivelmente haveria uma compartimentalização e “seqüestro” dos linfócitos T, uma vez que pode ocorrer o deslocamento dessas células do sangue periférico para o pulmão, reduzindo assim os níveis de células T circulantes (REIBMAN *et al.*, 1996; THOMAS *et al.*, 2002; URDANETA *et al.*, 1998). Mas já foi relatado por DJOMAND *et al.* (1994) que a redução de células T no sangue periférico não está relacionada com aumento da mortalidade de pacientes infectados pelo *M. tuberculosis*.

Também avaliamos o índice CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> que é muito importante para avaliação do balanço entre os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na resposta imune, e os valores absolutos encontrados de leucócitos e de linfócitos nestes grupos estudados (**Tabela 4**). Observamos que todos os valores estão dentro dos valores de referência atualmente aceitos. Dessa forma, mostramos que infecção pelo bacilo não acarretou alterações nos valores absolutos de leucócitos totais, de linfócitos e do balanço entre linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico. Porém, o grupo de pacientes TBAV apresentou um aumento significativo na quantidade de leucócitos do sangue periférico e uma diminuição significativa da quantidade de linfócitos o que demonstra

que nessa apresentação radiológica da TB os pacientes possuem menos linfócitos que são muito importantes na eliminação do bacilo, e aumento dos outros leucócitos no sangue periférico e que tal fato poderia estar relacionado com o maior comprometimento do pulmão nesses pacientes.

A avaliação dos linfócitos DN no sangue periférico através do estudo “ex vivo” também foi realizada, uma vez que os linfócitos DN  $\alpha\beta$  humanas parecem apresentar natureza regulatória, podendo estar associadas a várias doenças auto-imunes (FISCHER *et al.*, 2005; ; LIU *et al.*, 1998, 1999; SIELING *et al.*, 2000; THOMSON *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram que estas células apresentam um potencial protetor contra infecção por *Leishmania* e *Mycobacterium* em animais (AMPREY *et al.*, 2004; ANTONELLI *et al.*, 2006; DERRICK *et al.*, 2007). Já a subpopulação de linfócitos DN  $\gamma\delta$ , vários autores apontam a sua participação em infecções bacterianas e parasitárias humanas (AKBULUT *et al.*, 2009; AMPREY *et al.*, 2004; ANTONELLI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2003b, 2005b; COROMINAS *et al.*, 2004; GIOIA *et al.*, 2003; WENDLAND *et al.*, 2000).

Em nosso trabalho encontramos percentuais aumentados de linfócitos DN  $\alpha\beta$  em pacientes com TBAV quando comparados aos demais grupos estudados e valores normais dessas células nos pacientes TBNAV (**Figura 7**). Alguns trabalhos têm encontrado valores normais e diminuídos de células DN  $\alpha\beta$  no sangue periférico em pacientes com TB pulmonar, quando comparados com indivíduos saudáveis, porém, estes estudos não diferenciaram os pacientes com TB pulmonar nas diferentes apresentações radiológicas (IM *et al.*, 2008; IM *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 2008). Uma possibilidade para o aumento encontrado dessas células nos pacientes TBAV poderia ser uma maior estimulação dessas células pelos antígenos do bacilo em consequência do maior acometimento pulmonar encontrado nos mesmos.

Com relação aos linfócitos DN  $\gamma\delta$  não se encontrou diferenças nos percentuais dessas células analisadas quando comparamos pacientes TB pulmonar e controle (**Figura 9**). Por outro lado, quando classificamos os pacientes com TB em TBNAV e TBAV, percebemos que os pacientes TBNAV possuem o mesmo percentual de células DN  $\gamma\delta$  que os controles saudáveis, porém, os pacientes TBAV possuem uma

redução dessas células no sangue periférico, quando comparadas com controle saudável e pacientes TBNAV (**Figura 9**). Diferente da constante frequência dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  no sangue periférico de indivíduos saudáveis, as frequências observadas nos pacientes com TB variam amplamente. Vários estudos mostram que não há diferença entre o percentual de linfócitos DN  $\gamma\delta$  no sangue periférico de pacientes com TB pulmonar e controles no estudo “ex vivo” (AKBULUT *et al.*, 2009; BALIKO, 1997; BEHR-PERST *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2002; COROMINAS *et al.*, 2004; UETA *et al.*, 1994; YOSHIDA, 2001). Porém, LI *et al.* (1998) e GIOIA *et al.* (2003), mostraram uma diminuição dos percentuais dessas células nos pacientes com TB. A diferença observada nos percentuais de linfócitos DN  $\gamma\delta$  entre pacientes TBNAV e TBAV pode ser devido ao fato de que a ligação do TCR  $\gamma\delta$  com antígenos do bacilo induziria a uma expressão aumentada de moléculas Fas em linfócitos DN  $\gamma\delta$  cronicamente ativadas que resultaria na ativação da morte programada dessas células (apoptose) (DUARTE *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1998; MANFREDI *et al.*, 1998). Provavelmente, essa hipótese explicaria, pelo menos em parte, a diminuição dessas células no sangue periférico. Outra hipótese seria a diminuição dessas células na corrente sanguínea provocada por uma exaustão do organismo em produzi-las devido a um longo e/ou intenso período de estimulação antigênica pelo *M tuberculosis* nos pacientes TBAV.

Estudos realizados por CARL *et al.* (1999) relatam que, mudanças dos marcadores de superfície leucocitária definem especificamente as diferentes fases da ativação celular, podendo assim, distinguir entre as fases efetora da resposta imune e de memória imunológica.

Assim, para estudarmos a ativação dos linfócitos DN na infecção pelo *M. tuberculosis* avaliamos a expressão dos marcadores de superfícies CD28, CD69 e HLA-DR, através do estudo “ex vivo”, nestas células obtidas no sangue periférico de pacientes com TB e controles saudáveis.

Em nossos resultados observamos uma expressão diminuída de CD28 pelos linfócitos DN  $\gamma\delta$  de pacientes TBAV quando comparados com pacientes TBNAV e controles (**Figura 10**). HAYDAY (2000) mostra que a expressão de CD28 por

linfócitos DN  $\gamma\delta$  é variável e não está claro se essas células utilizam CD28 para interação com B7 em APC's profissionais. Porém, ANTONELLI *et al.* (2006) discutem a interação de CD28 com seus ligantes nas células DN  $\gamma\delta$  como tendo importante papel na ativação dessas células, uma vez que elas não expressam CD4 e CD8, e assim, não sofrem *down-regulation* após ativação. Alguns estudos demonstram a participação da molécula CD28 na proteção contra apoptose (BOISE *et al.*, 1995; RAJAVELU & DAS, 2008). BHATT *et al.* (2009) estudaram camundongos geneticamente alterados durante a infecção pelo bacilo *M. tuberculosis* que não expressavam CD28. Eles mostraram que na fase aguda da infecção não há nenhuma diferença no curso da doença com relação ao grupo controle. Porém, na fase crônica eles observaram que as células dos animais que não expressam CD28 não formam granulomas e, conseqüentemente, as lesões se espalharam pelo pulmão destes animais. Assim, os autores mostraram que a molécula CD28 é importante para formação do granuloma e manutenção dos bacilos no foco da infecção em camundongos. Dessa forma, podemos inferir que a menor quantidade de células DN  $\gamma\delta$  nos pacientes TBAV poderia ser devido a apoptose das células ativadas, uma vez que essas expressam grandes quantidades de Fas, o que também está de acordo com nosso achado de que estes pacientes TBAV possuem um percentual diminuído de células DN  $\gamma\delta$ . Além disso, o maior acometimento pulmonar encontrado nos pacientes TBAV poderia ser devido à expressão diminuída de CD28 por esses pacientes, já que essa molécula é importante na regulação de resistência a vários patógenos como demonstrado por BHATT *et al.* (2009) para *M. tuberculosis* em camundongos.

COROMINAS *et al* (2004) não encontraram diferença na expressão de CD28 em células DN  $\gamma\delta$  em pacientes com TB e controles saudáveis. Em nossos resultados também não há diferença na expressão de CD28 entre controles e pacientes TBNAV (**Figura 10**). A perda ou diminuição desse sinal co-estimulatório pode resultar em uma ativação parcial dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  ou mesmo um estado anérgico sugerindo possíveis eventos imunorregulatórios uma vez que encontramos níveis elevados de IL-10 nessa apresentação radiológica da doença (**Figura 12**). Dessa forma, tal diminuição de CD28 nos linfócitos DN  $\gamma\delta$  de pacientes com TBAV poderia ser devida

a um processo de imunorregulação do organismo com relação a essas células ativadas ou a apoptose como já mencionado anteriormente.

BEHAR *et al.* (2007) mostraram independência de B7 (co-estimulação via CD28) para ativação de células DN  $\alpha\beta$ , o que está de acordo com nossos resultados que não demonstram diferença estatística na expressão desse marcador nos pacientes com TB e controle saudável (**Figura 8**). Dessa forma, parece que essa molécula não é um bom marcador de ativação para avaliação dessa subpopulação de células DN no sangue periférico.

Na subpopulação de linfócitos DN  $\alpha\beta$  observamos maior expressão de CD69 entre os pacientes TB quando comparados com controle (**Figura 8**), o que demonstra que essas células estão ativadas na TB, e observamos também que essa ativação não difere com relação as apresentações radiológicas da TB. Já com relação aos linfócitos DN  $\gamma\delta$  os pacientes com TBNAV expressam as maiores quantidades desse marcador comparadas com pacientes com TBAV e controle (**Figura 10**). Os pacientes TBAV expressam mais CD69 que o controle, mas menos que os pacientes TBNAV. Isso poderia refletir a possibilidade de uma menor contribuição de ativação recente nos TBAV. Por outro lado, existe ainda a possibilidade das células expressarem ativação recente uma vez que não podemos excluir a hipótese da ativação precoce dessas células representar um fenômeno compartimentalizado não detectável no sangue periférico porque as células exibindo este marcador poderiam ter migrado para o sítio de infecção.

SKOBERNE *et al.* (2000) mostraram em seu trabalho que a expressão de CD69 em linfócitos, após estímulo antigênico, está relacionado com uma resposta do tipo Th<sub>1</sub> atuando contra o bacilo *M. tuberculosis*. Em nosso estudo essa relação (CD69 com perfil Th<sub>1</sub> de citocinas) não pode ser verificada nas células DN  $\alpha\beta$ , porém, nas células DN  $\gamma\delta$ , observou-se que nos pacientes com TBNAV há uma maior expressão de CD69 (**Figura 10**) e estas células exibem perfil de citocinas, após estímulo antigênico, do tipo Th<sub>1</sub> (IFN- $\gamma$ ), enquanto que nos pacientes com TBAV, tais células expressam menos CD69 e produzem quantidades estatisticamente maiores de IL-10 (**Figura 12**).

A expressão de HLA-DR na superfície celular denota principalmente ativação celular. Nossos resultados mostram que os linfócitos DN  $\gamma\delta$  de pacientes com TB se encontravam ativadas no sangue periférico, uma vez que expressam significativamente maior quantidade de HLA-DR que os indivíduos do grupo controle (**Figura 10**). Além disso, foi encontrada menor expressão desse marcador de ativação nos pacientes TBAV, o que também poderia sugerir um possível *down-regulation* induzido pelos antígenos do bacilo no sistema imune dos pacientes ou mesmo apoptose dessas células. UETA *et al.* (1994) demonstraram que pessoas saudáveis em contato com pacientes com TB expressam maior quantidade de células DN  $\gamma\delta$  com o marcador de ativação HLA-DR e discutem que tal achado poderia contribuir para resistência desses indivíduos a invasão do bacilo. BEHR-PERST *et al.* (1999) mostraram que células DN  $\gamma\delta$  de pacientes com TB, após contato com monócitos infectados com o bacilo *M. tuberculosis in vitro*, expressam maior quantidade de HLA-DR. Dessa forma, podemos inferir que as células DN  $\gamma\delta$  dos pacientes TBAV expressariam maiores níveis de HLA-DR contribuindo para o melhor controle da infecção e, conseqüentemente, menor comprometimento pulmonar.

NIEHUES *et al.* (1999) acharam expressão elevada de linfócitos DN  $\alpha\beta$  que expressam HLA-DR em indivíduos saudáveis, o que demonstra uma pré ativação dessas células *in vivo*. Após estímulo antigênico, essas células apresentam níveis mais elevados de HLA-DR que os encontrados nos indivíduos saudáveis. Nossos resultados também demonstram grande expressão de HLA-DR pelos controles e uma expressão ainda maior pelos pacientes TB, não tendo diferença entre as apresentações radiológicas da doença (**Figura 8**). MONTROYA *et al.* (2008) também encontraram expressão aumentada do marcador de ativação HLA-DR em pacientes com TB, porém, não avaliaram as diferentes apresentações radiológicas da TB pulmonar.

Portanto, a expressão desses marcadores de ativação, pelos subtipos celulares em questão, representa um perfil que é compatível com exposição prévia antigênica e ativação recente. Além disso, verificamos que pacientes com TBAV expressam menos marcadores de ativação em células DN  $\gamma\delta$ , e que tal fato poderia ser utilizado

como um marcador auxiliar tanto no diagnóstico como no acompanhamento da cura de pacientes com TB pulmonar.

A resposta imune do tipo celular é a mais importante na defesa contra infecção por patógenos intracelulares. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, DN, macrófagos e células NK desempenham papéis importantíssimos na defesa e destruição do *M. tuberculosis*. As citocinas pró e antiinflamatórias possuem papel chave na proteção e patogenia pelo bacilo, e seu balanço pode controlar ou predispor a injúrias teciduais (SAHIRATMADJA *et al.*, 2007). As citocinas proinflamatórias, ditas do perfil Th<sub>1</sub>, são muito importantes na defesa do organismo, uma vez que estimulam os macrófagos infectados a destruírem os bacilos. A citocina TNF- $\alpha$  também é muito importante na defesa uma vez que estimula principalmente o recrutamento de células para o local da infecção e consequente formação do granuloma mantendo os bacilos na forma “dormente” (LIN *et al.*, 2007). A importância dessa citocina é bem evidenciada em pacientes que utilizam medicamentos bloqueadores de TNF, nos quais frequentemente observa-se reativação da infecção pelo bacilo (SALIU *et al.*, 2006; WALLIS, 2007). Já as citocinas ditas regulatórias, do perfil Th<sub>2</sub>, diminuem os efeitos inflamatórios da reação imune. Dentre elas, podemos citar a IL-10 que é capaz de regular a expressão de MHC-II e co-estimuladores, além de possuir efeito imunossupressor em células T.

A avaliação fenotípica de uma população celular nos fornece informações sobre possíveis funções desempenhadas. No entanto, para um melhor entendimento de sua participação como população efetora, torna-se necessária a análise das citocinas produzidas em resposta à infecção.

JO *et al.* (2003) observam que os níveis de IFN- $\gamma$  são elevados em pacientes com TB e sugerem que esta citocina é muito importante na resposta imune ao bacilo. Porém, outros estudos mostram que pacientes com TB grave apresentam uma supressão da produção de IFN- $\gamma$  e um aumento de IL-10 comparado com pacientes com TB menos grave que possuem alta resposta de IFN- $\gamma$ , e que os seus níveis, se correlacionam inversamente com a gravidade da doença (DLUGOVITZKY *et al.*, 1997; GUYOT-REVOL *et al.*, 2006; LIENHARDT *et al.*, 2002; SAHIRATMADJA *et al.*,

2007; SHARMA *et al.*, 2002). JAMIL *et al.* (2007) mostraram que a razão IFN- $\gamma$ /IL-10 é maior para pacientes com TB menos grave e menor para pacientes com TB mais grave, evidenciando assim maior participação de IL-10 na doença avançada, e em contrapartida, maior participação de IFN- $\gamma$  na doença menos avançada. Em nosso trabalho encontramos resultados semelhantes com relação às células DN no qual observamos uma reduzida produção de citocinas do perfil Th<sub>1</sub> pelos linfócitos DN na TBAV enquanto que na TBNAV há um predomínio de citocinas do perfil Th<sub>1</sub> (**Figuras 11 e 12**). Além disso, observamos que os linfócitos DN  $\gamma\delta$  produzem níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  que os linfócitos DN  $\alpha\beta$ . Por outro lado as células DN  $\alpha\beta$  produzem níveis maiores de IL-10 que as células DN  $\gamma\delta$  (**Figuras 11 e 12**). Dessa forma, parece que nas diferentes apresentações radiológicas da TB as células DN possuem características distintas sendo que as DN  $\gamma\delta$  exibem um perfil mais inflamatório enquanto que as DN  $\alpha\beta$  um perfil mais imunorregulatório. Assim, ao analisarmos as células DN encontramos que nos pacientes com TBNAV observa-se uma maior produção da citocina IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e nos pacientes TBAV observamos predomínio da citocina IL-10 (**Figuras 12 e 13**).

Os linfócitos DN  $\alpha\beta$  podem produzir tanto citocinas Th<sub>1</sub> (IFN- $\gamma$ ) quanto Th<sub>2</sub> (IL-10) (BORN *et al.*, 2006, 2007; EXLEY *et al.*, 1997; HOU *et al.*, 2003; IM *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2002). NIEHUES *et al.* (1999) demonstraram produção de grande quantidade de IL-10 por células DN  $\alpha\beta$ , após estímulo antigênico inespecífico *in vitro*, demonstrando possível papel regulatório dessas células. Em nossos resultados observamos que as células DN  $\alpha\beta$  produzem maiores quantidades de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos pacientes TBNAV e maiores níveis de IL-10 nos TBAV, o que evidencia o potencial misto de produção de citocinas por essas células nos pacientes com TB e potencial participação dessas células nas diferentes apresentações radiológicas da TB. STENGER & MODLIN (1999) mostraram que os linfócitos DN  $\alpha\beta$  produzem IFN- $\gamma$  através de contato com células alvo que possuem antígenos lipídicos e glicolípides do bacilo. Porém, outros estudos que avaliaram a produção de citocinas na infecção pelo *M. tuberculosis* pelos linfócitos DN  $\alpha\beta$  não foram encontrados.

Segundo CARDING & PAUL (2002) as células DN  $\gamma\delta$  participam tanto dos estágios iniciais quanto dos tardios durante a infecção de diferentes patógenos. Segundo o autor, nos estágios iniciais, essas células podem, através da produção de citocinas pró-inflamatórias modular a resposta imune inata das células NK e macrófagos e resposta imune adaptativa de células T  $CD4^+ \alpha\beta$ . Já na fase tardia da infecção, essas células podem liberar citocinas antiinflamatórias ou imunorregulatórias, exibir atividade citotóxica contra macrófagos ativados, além de regeneração tecidual. Em nosso trabalho observamos que essas células nos pacientes com TBNAV produzem principalmente citocinas proinflamatórias e em pacientes com TBAV produzem principalmente citocina regulatória (**Figuras 12 e 13**).

HAYDAY, (2000) relata que as principais características das células DN  $\gamma\delta$  são os efeitos citolíticos (perforinas e granzimas), expressão de FasL e alta produção de IFN- $\gamma$  (comportamento predominantemente do tipo  $Th_1$ ) e que são estimuladas no sangue periférico respondendo a infecções com expressão de marcadores de ativação e produção de citocinas, e, geralmente, estão intimamente relacionadas à resposta efetora das células T  $\alpha\beta$ .

TSUKAGUCHI *et al.*, (1999) mostram que os linfócitos DN  $\gamma\delta$  de pacientes com TB são mais eficientes em produzir IFN- $\gamma$  após estímulo antigênico que as células T  $CD4^+ \alpha\beta$ . Além disso, as células DN  $\gamma\delta$  de pacientes com TB também produzem TNF- $\alpha$ . LI *et al.*, (2008) mostram que células DN  $\gamma\delta$  produzem níveis elevados de IFN- $\gamma$  após estímulo com antígenos do bacilo *in vitro*. Resultados similares foram encontrados em nosso trabalho no grupo de pacientes TBNAV (**Figuras 12 e 13**). YOSHIDA, (2001) demonstram que células DN  $\gamma\delta$  de pacientes com TB produziram menos IFN- $\gamma$  que o grupo controle. Encontramos resultados similares quando comparamos pacientes TBAV e controle. Porém, não foram encontrados estudos que avaliaram a participação dos linfócitos DN  $\gamma\delta$  em diferentes apresentações radiológicas da TB.

Com base nos resultados obtidos dos níveis de citocinas encontrados em nosso trabalho, percebemos que na TBNAV ambas as células produzem predominantemente citocinas do perfil  $Th_1$  (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), sendo que os linfócitos

DN  $\gamma\delta$  produzem, estatisticamente, mais IFN- $\gamma$  que os linfócitos DN  $\alpha\beta$ . Assim, essas citocinas estariam atuando na tentativa de eliminar os bacilos e impedir sua multiplicação na TBNAV uma vez que os danos causados nos pulmões ainda estão sendo controlados.

Vários fatores associados muitas vezes intrínsecos ao paciente ou ao *M. tuberculosis* fazem com que essa resposta não seja suficiente para conter a infecção pelo bacilo e a doença progride. Devida a grande estimulação do organismo e, talvez, a outros fatores, observamos nesses pacientes com TBNAV uma grande diminuição da produção de citocinas do perfil Th<sub>1</sub> e uma maior produção da citocina regulatória IL-10 por ambos os linfócitos DN. Porém, as células DN  $\alpha\beta$  produziram estatisticamente mais IL-10 que as células DN  $\gamma\delta$ . Essa grande quantidade de citocina antiinflamatória nesses pacientes parece ser um fator muito importante para justificar a evolução da doença gerando como consequência maiores lesões pulmonares.

Sugerimos que maiores estudos sejam realizados e com uma amostragem maior de pacientes para que os resultados obtidos neste trabalho se confirmem. Além disso, a avaliação de um maior número de pacientes durante o tratamento farmacológico permitirá a avaliação dos marcadores de ativação e perfis de citocinas dos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  ao longo do processo de cura ou falha terapêutica, e dessa forma, será possível validar a utilização dos mesmos como marcadores de melhora clínica dos pacientes com TB pulmonar.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos na avaliação de parâmetros imunofenotípicos e da produção de citocinas intracitoplasmáticas pelos linfócitos DN  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$  de pacientes com TBNAV e TBAV concluiu-se que:

- 1- A infecção pelo *M. tuberculosis* não acarretou alterações nos valores absolutos de leucócitos totais e linfócitos do sangue periférico de pacientes com TB avaliados.
- 2- Através da análise dos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  pelo estudo “ex vivo” foi possível a diferenciação de pacientes TBNAV e TBAV uma vez que as células DN  $\alpha\beta$  se encontram aumentadas no sangue periférico de pacientes TBAV e em níveis estatisticamente iguais nos TBNAV e indivíduos controle saudáveis. Já as células DN  $\gamma\delta$  se encontram diminuídas nos pacientes com TBAV e em níveis estatisticamente iguais nos pacientes TBNAV e indivíduos controle saudáveis.
- 3- A expressão dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR pelos linfócitos DN  $\alpha\beta$  é aumentada nos pacientes TB, mas não difere entre TBNAV e TBAV, portanto, sendo útil apenas para identificação de pacientes com TB. A expressão de CD28 por essas células não diferiu entre os grupos estudados demonstrando que esse não é um bom marcador de diagnóstico e/ou prognóstico.
- 4- Através da avaliação da expressão de CD69 e HLA-DR nos linfócitos DN  $\gamma\delta$  foi possível a identificação de pacientes TBNAV nos quais se encontram em níveis aumentados. Também foi possível a identificação de TBAV uma vez que esses pacientes apresentaram expressão reduzida dos marcadores CD28, CD69 e HLA-DR.
- 5- A avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas produzidas pelos linfócitos DN  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  após estimulação antigênica *in vitro* permitiu diferenciar

os pacientes TBNAV e TBAV. Observou-se maior produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no TBNAV e de IL-10 no TBAV em ambas as células. As células DN  $\gamma\delta$  mostraram ser melhores produtoras de IFN- $\gamma$  nos pacientes TBNAV enquanto que as células DN  $\alpha\beta$  são melhores produtoras de IL-10 nos pacientes TBAV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE, F.; BJUNE, G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and Experimental Immunology**. Vol. 157, p. 235–243. 2009.
- ACUTO, O.; MICHEL, F. CD28-MEDIATED CO-STIMULATION: A QUANTITATIVE SUPPORT FOR TCR SIGNALLING. **NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY**. Vol. 3, p. 939-951. 2003
- AKAKI, T.; TOMIOKA, H.; SHIMIZU, T.; DEKIO, S.; SATO, K. Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen in expression of the anti-microbial activity of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Exp. Immunol.** vol. 121, p. 302-310. 2000.
- AL-MOAMARY, M. S.; BLACK, W.; KEVIN, E. B. R.; VEDAL, S. The Significance of the Persistent Presence of Acid-fast Bacilli in Sputum Smears in Pulmonary Tuberculosis. **Chest**. Vol. 116, p. 726-731. 1999.
- ALGOOD, H. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis **Cytokine. Growth Factor Rev.** vol. 14 (6), p. 467-477. 2003.
- AMPREY, J.L.; IM, J. S.; TURCO, S. J.; MURRAY, H. W.; ILLARIONOV, P. A.; BESRA, G. S.; *et al.* A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. **J Exp Med.** vol. 200(7), p. 895-904. 2004.
- ANTAS, P. R.; CASTELLO-BRANCO, L. R. New vaccines against tuberculosis: lessons learned from BCG immunisation in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** Vol. 102(7), p. 628-30. 2008.
- ANTONELLI, L. R. V.; *et al.* Diapartite Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**. vol.74, n.11, p. 6317-6323. 2006.
- ARONSON, J. D. Protective vaccination against tuberculosis with special reference to BCG vaccination. **Am Rev Tuberc.** Vol. 58, p. 255-281. 1948.
- ATS. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children . **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** Vol. 161, n. 4, p. 1376-1395. 2000.
- BALBI, B.; VALLE, M. T. ; ODDERA, S.; GIUNTI, D.; MANCA, F.; ROSSI, G. A.; ALLEGRA, L. T-lymphocytes with gamma delta+ V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. **Am Rev Respir Dis.** Vol. 148(6), p. 1685-1690. 1993.

BALIKO, Z. N.; SZEREDAY, L. S.; SZEKERES-BARTHO, J.  $\gamma\delta$  T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Thorax**. Vol. 52, p. 375-377. 1997.

BARCELOS, W.; MARTINS-FILHO, O. A.; GUIMARÃES, T. M.; OLIVEIRA, M. H.; SPÍNDOLA-DE-MIRANDA, S.; CARVALHO, B. N.; TOLEDO, V. P. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. **Microbiol Immunol**. Vol. 50(8), p. 597-605. 2006.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L.; SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**. Vol. 30;285(5428), p. 727-729. 1999.

BECK JM. The immunocompromised host: HIV infection. **Proc Am Thorac Soc**. Vol. 2(5), p. 423-427. 2005.

BECKMAN, E. M.; PORCELLI, S. A.; MORITA, C. T.; BEHAR, S. M.; FURLONG, S. T.; BRENNER, M. B. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. **Nature**. Vol. 15;372(6507), p. 691-694. 1994.

BEHAR, S.M.; PORCELLI, S.A., BECKMAN, E.M., BRENNER, M.B. A pathway of costimulation that prevents anergy in CD28 -T cells: B7-independent costimulation of CD1restricted T cells. **J. Exp. Med**. vol. 182, p. 2007-2019. 1995.

BEHR-PERST, S.I.; MUNK, M.E.; SCHABERG, T.; ULRICH, T.; SCHULZ, R.J.; KAUFMANN, S.H.E. Phenotypically Activated  $\gamma\delta$  T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**. Vol. 180, p141-149. 1999.

BHATT, K.; SALGAME, P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Immunol**. Vol. 27(4), p. 347–362. 2007.

BHATT, K.; UZELAC, A.; MATHUR, S.; MCBRIDE, A.; POTIAN, J.; SALGAME, P. B7 costimulation is critical for host control of chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**. Vol. 15;182(6), p. 3793-3800. 2009.

BOISE, L.H.; MINN, A.J.; NOEL, P.J.; JUNE, C.H.; ACCAVITTI, M.A.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C.B. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. **Immunity**. Vol. 3(1), p. 87-98. 1995.

BOOM, W.H.; CANADAY, D.H.; FULTON, S.A.; GEHRING, A.J.; ROJAS, R.E.; TORRES, M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis (Edinb)**. Vol. 83(1-3), p. 98-106. 2003.

BORN, W.K.; REARDON, C.L.; O'BRIEN, R.L. The function of  $\gamma\delta$  T cells in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**. Vol. 18, p. 31-38. 2006.

BORN, W. K.; JIN, N.; AYDINTUG, M.K.; WANDS, J.M.; FRENCH, J.D.; ROARK, C.L.; O'BRIEN, R.L.  $\gamma\delta$  T Lymphocytes—Selectable Cells Within the Innate System? **Journal of Clinical Immunology**. Vol. 27, n. 2. 2007.

BRANDES, M.; WILLIMANN, K.; LANG, A.B.; NAM, K.H.; JIN, C.; BRENNER, M.B.; MORITA, C.T.; MOSER, B. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. **Blood**. Vol. 15;102(10), p. 3693-3701. 2003.

BRANDES, M.; WILLIMANN, K.; MOSER, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. **Science**. Vol. 8;309(5732), p. 264-268. 2005.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose – Uma proposta de integração ensino-serviço. 5. ed. Rio de Janeiro. 2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: Guia Vigilância Epidemiológica. Brasília; Fundação Nacional de Saúde. 100 p. 2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2005.

BROOKS, E.G.; BALK, S.P.; AUPEIX, K.; COLONNA, M.; STROMINGER, J.L.; GROH-SPIES, V. Human T-cell receptor (TCR) alpha/beta + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V beta-gene families, and phenotypically resemble memory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. vol. 15;90(24), p. 11787-11791. 1993.

BUKOWSKI, J.F.; CRAIG, T.M.; BRENNER, M.B. Human  $\gamma\delta$  T Cells Recognize Alkylamines Derived from Microbes, Edible Plants, and Tea. **Immunity**. Vol. 11, p. 57-65. 1999.

CACCAMO, N.; *et al.* A Subset of Vgamma9V-delta2 T cells help B cells for antibody production. **Haematologica Rep**. vol. 2, p 10-13. 2006.

CAMARGOS, P.A.M.; GUIMARÃES, M.D.; ANTUNES, C.M. Risk assessment for acquiring meningitis tuberculosis among children not vaccinated with BCG: a case-control study. **Int J Epidemiol**. Vol. 17, p. 193-197. 1988.

CANADAY, D.H.; ZIEBOLD, C.; NOSS, E.H.; CHERVENAK, K.A.; HARDING, C.V.; BOOM, W.H. Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. **J Immunol**. Vol. 1;162(1), p. 372-379. 1999.

CANADAY, D.H.; WILKINSON, R.J.; LI, Q.; HARDING, C.V.; SILVER, R.F.; BOOM, W.H. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. **J Immunol**. Vol. 1;167(5), p. 2734-2742. 2001.

CARDING, S.R.; PAUL, J.E.  $\gamma\delta$  T CELLS: FUNCTIONAL PLASTICITY AND HETEROGENEITY. **Nat Rev Immunol**. Vol. 2(5), p. 336-345. 2002.

CARL, G.F.; BEAN, S.G.D.; HOOI, H.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and immunity**. vol. 67, n. 7, p. 3242-3247. 1999.

CARULLI, G.; LAGOMARSINI, G.; AZZARÀ, A.; TESTI, R.; RICCIONI, R.; PETRINI, M. Expansion of TcR alphabeta+CD3+CD4-CD8- (CD4/CD8 double-negative) T lymphocytes in a case of staphylococcal toxic shock syndrome. **Acta Haematol.** Vol. 111(3), p. 163-167. 2004.

CARUSO, A.M.; SERBINA, N.; KLEIN, E.; TRIEBOLD, K.; BLOOM, B.R.; FLYNN, J.L. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. **J Immunol.** Vol. 162(9), p. 5407-5416. 1999.

CARVALHO, A.C.C.; MATTEELLI, A.; AIRÒ, P.; TEDOLDI, S.; CASALINI, C.; IMBERTI, L.; CADEO, G.P.; BELTRAME, A.; CAROSI, G. gd T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis with and without HIV co-infection. **Thorax.** Vol. 57, p. 357-360. 2002.

CASTELO FILHO, A.; *et al.* II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **J. bras. pneumol.** vol.30(1). 2004.

CHEN, W.; FORD, M.S.; YOUNG, K.J.; CYBULSKY, M.I.; ZHANG, L. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. **J Immunol.** Vol. 15;170(4), p. 1846-1853. 2003.

CHEN, Z.W.; LETVIN, N.L. Vgamma2Vdelta2+ T cells and anti-microbial immune responses. **Microbes Infect.** Vol. 5(6), p 491-498. 2003.

CHEN, W.; FORD, M.S.; YOUNG, K.J.; ZHANG, L. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. **Transplant Proc.** Vol. 35(7), p. 2479-2480. 2003.

CHEN, W.; ZHOU, D.; TORREALBA, J.R.; WADDELL, T.K.; GRANT, D.; ZHANG, L. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. **J Immunol.** Vol. 1;175(5), p. 3409-3416. 2005.

CHEN, Z.W. Immune regulation of gamma T cell responses in mycobacterial infections. **Clinical Immunology.** Vol. 116, p. 202-207. 2005.

CIPRIANI, B.; BORSELLINO, G.; POCCIA, F.; PLACIDO, R.; TRAMONTI, D.; BACH, S.; BATTISTINI, L.; BROSANAN, C.F. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gamma delta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. **Blood.** Vol. 95, p. 39-47. 2000.

COLDITZ, G.A.; BREWER, T.F.; BERKEY, C.S.; WILSON, M. E.; BURDICK, E.; FINEBERG, H.V.; *et al.* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. **JAMA.** Vol. 271(9): p. 698-702. 1994.

COLDITZ, G.A.; BERKEY, C.S.; MOSTELLER, F.; BREWER, T.F.; WILSON, M.E.; BURDICK, E.; *et al.* The efficacy of Bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. **Pediatrics**. Vol. 96(1), p. 29-35. 1995.

COLLINS, D.M.; LISLE, G.W.D. BCG identification by DNA restriction fragment patterns. **J Gen Microbiol**. Vol. 133, p. 1431-1434. 1987.

COMSTOCK, G.W.; EDWARDS, P.Q. An American view of BCG vaccination, illustrated by results of a controlled trial in Puerto Rico. **Scand J Resp Dis**. Vol. 53, p. 207-217. 1972.

CONDE, M.B.; *et al.* III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J Bras Pneumol**. Vol. 35(10), p. 1018-1048. 2009.

CONSTANT, P.; DAVODEAU, F.; PEYRAT, M.A.; POQUET, Y.; PUZO, G.; BONNEVILLE, M.; FOURNIÉ, J.J. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. **Science**. Vol. 8;264(5156), p. 267-270. 1994.

COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFIN, J.P.; RUSSELL, D.G.; ORME, I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J Exp Med**. Vol. 1;178(6), p. 2243-2247. 1993.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22(11), p. 633-640. 2001.

CORBETT, E.L.; DE COCK, K.M. Tuberculosis in the HIV-positive patient. **Br J Hosp Med**. Vol. 56(5), p. 200-204. 1996.

COROMINAS, M.; CARDONA, V.; GONZALEZ, L.; CAYLÀ, J.A.; RUFÍ, G.; MESTRE, M.; BUENDIA, E. B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in Mycobacterium tuberculosis infection. **INT J TUBERC LUNG DIS**. Vol. 8(1), p. 98-105. 2004.

CORVAISIER, M.; MOREAU-AUBRY, A.; DIEZ, E.; BENNOUNA, J.; MOSNIER, J.F.; SCOTET, E.; BONNEVILLE, M.; JOTEREAU, F. V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cell response to colon carcinoma cells. **J Immunol**. Vol. 15;175(8), p. 5481-5488. 2005.

COSTA, M.C.N.; MOTA, E.L.A.; PINTO, L.L.S. Efeito protetor do BCG intradérmico na Meningite Tuberculosa. **Bol Of Sanit Panam**. Vol. 110, p. 26-32. 1991.

COWLEY, S.C.; HAMILTON, E.; FRELINGER, J.A.; SU, J. FORMAN, J.; ELKINS, K.L. CD4-CD8- T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo. **J Exp Med**. Vol. 18;202(2), p. 309-319. 2005.

DANTAS, O.; XIMENES, R.A.; DE ALBUQUERQUE, M. DE F.; DA SILVA, N.L.; MONTARROYOS, U.R.; DE SOUZA, W.V.; *et al.* A case-control study of protection against tuberculosis by BCG revaccination in Recife, Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**. Vol. 10, p. 536-541. 2006.

DAS, H.; GROH, V.; KUIJL, C.; SUGITA, M.; MORITA, C.T.; SPIES, T.; BUKOWSKI, J.F. MICA engagement by human Vgamma2 Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function **Immunity**. Vol. 15(1), p. 83-93. 2001.

DE LA BARRERA, S.S.; FINIASZ, M.; FRIAS, A.; ALEMÁN, M.; BARRIONUEVO, P.; FINK, S.; FRANCO, MC.; ABBATE, E.; DEL, C.; SASIAIN, M. Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. **Clin Exp Immunol**. Vol. 132(3), p. 450-461. 2003.

DERRICK, S.C.; EVERING, T.H.; SAMBANDAMURTHY, V.K.; JALAPATHY, K.V.; HSU, T.; CHEN, B.; *et al.* Characterization of the protective T-cell response generated in CD4-deficient mice by a live attenuated Mycobacterium tuberculosis vaccine. **Immunology**. Vol. 120(2), p. 192-206. 2007.

DIELI, F.; TROYE-BLOMBERG, M.; IVANYI, J.; FOURNIÉ, J.J.; KRENSKY, A.M.; BONNEVILLE, M.; PEYRAT, M.A.; CACCAMO, N.; SIRECI, G.; SALERNO, A. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. **J Infect Dis**. Vol. 15;184(8), p. 1082-1085. 2001.

DIELI, F.; TANIGUCHI, M.; KRONENBERG, M.; SIDOBRE, S.; IVANY, J.; FATTORINI, L.; IONA, E.; OREFICI, G.; LEO De, G.; RUSSO, D.; CACCANO, N.; SIRECI, G.; SANODI, C.; SALERNO, A. An Anti-Inflammatory Role for Vα14 NK T cells in Mycobacterium bovis Bacillus Calmete-Guérin-Infected Mice. **J. Immunol**, v. 171, p. 1961-1968, 2003.

DJOMAND, G.; DIABY, L.; N'GBICHI, J.M.; *et al.* Idiopathic CD4+ Tlymphocyte depletion in a west African population. **AIDS**. Vol. 8, p. 843-847. 1994.

DLUGOVITZKY, D.; TORRES-MORALES, A.; RATENI, L.; FARRONI, M.A.; LARGACHA, C.; MOLTENI, O.; BOTTASSO, O. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. **FEMS Immunol Med Microbiol**. Vol. 18(3), p. 203-207. 1997.

DORMAN, S.E.; PICARD, C.; LAMMAS, D.; HEYNE, K.; VAN DISSEL, J.T.; BARETTO, R.; *et al.* Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. **Lancet**. Vol. 364(9451), p. 2113-2121. 2004.

DOURADO, I.; RIOS, M.H.; PEREIRA, S.M.; CUNHA, S.S.; ICHIHARA, M.Y.; GOES, J.C.; *et al.* Rates of adverse reactions to first and second doses of BCG vaccination: results of a large community trial in Brazil schoolchildren. **Int J Tuberc Lung Dis**. Vol. 7, p. 399-402. 2003.

DUARTE, R.; KINDLELÁN, J.M.; CARRACEDO, J.; SÁNCHEZ-GUIJO, P.; RAMÍREZ, R. Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis in gamma/delta T lymphocytes from patients with advanced clinical forms of active tuberculosis. **Clin Diagn Lab Immunol**. Vol. 4(1), p. 14-18. 1997.

ELLNER, J.J. Immunosuppression in tuberculosis. **Infect Agents Dis**. Vol. 5(2), p. 62-72. 1996.

EXLEY, M.; GARCIA, J.; BALK, S.P.; PORCELLI, S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4- CD8- T cells. **J Exp Med**. Vol. 186, p. 109-120. 1997.

FISCHER, K.; VOELKL, S.; HEYMANN, J.; PRZYBYLSKI, G.K.; MONDAL, K.; LAUMER, M.; KUNZ-SCHUGHART, L.; SCHMIDT, C.A.; ANDREESEN, R.; MACKENSEN, A. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. **Blood**. Vol. 1;105(7), p. 2828-2835. 2005.

FLYNN, J.L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; BLOOM, B.R. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med**. Vol. 178(6), p. 2249-2254. 1993.

FORD, M.S.; YOUNG, K.J.; ZHANG, Z.; OHASHI, P.S.; ZHANG, L. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo: **J Exp Med**. Vol. 15;196(2), p. 261-267. 2002.

GARDAM, M.A.; KEYSTONE, E.C.; MENZIES, R.; MANNERS, S.; SKAMENE, E.; LONG, R.; *et al.* Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. **Lancet Infect Dis**. Vol. 3(3), p. 148-155. 2003.

GILLERON, M.; STENGER, S.; MAZORRA, Z.; WITTKE, F.; MARIOTTI, S.; BÖHMER, G.; PRANDI, J.; MORI, L.; PUZO, G.; DE LIBERO, G. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**. Vol. 1;199(5), p. 649-659. 2004.

GIOIA, C.; AGRATI, C.; GOLETTI, D.; VINCENTI, D.; CARRARA, S.; AMICOSANTE, M.; CASARINI, M.; GIOSUE, S.; PUGLISI, G.; ROSSI, A.; COLIZZI, V.; PUCILLO, L.P.; POCCIA, F. Different cytokine production and effector/memory dynamics of alpha beta+ or gamma delta+ T-cell subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. **Int J Immunopathol Pharmacol**. Vol. 16(3), p. 247-252. 2003.

GROH, V.; FABBI, M.; HOCHSTENBACH, F.; MAZIARZ, R.T.; STROMINGER, J.L. Double-negative (CD4-CD8-) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. vol. 86(13), p. 5059-5063. 1989.

GULER, R.; OLLEROS, M.L.; VESIN, D.; PARAPANOV, R.; GARCIA, I. Differential effects of total and partial neutralization of tumor necrosis factor on cell-mediated immunity to Mycobacterium bovis BCG infection. **Infect Immun**. Vol. 73(6), p. 3668-3676. 2005.

GUNDOGDU, Z.; AYDOGAN, M.; ARISOY, E. S.; GOKALP, A.S. Effect of number of BCG vaccination on tuberculin induration size. **Journal of Paediatrics and Child Health**. Vol. 43, p. 476-479. 2007.

GUYOT-REVOL, V.; INNES, J.A.; HACKFORTH, S.; HINKS, T.; LALVANI, A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**. Vol. 173, p. 803-810. 2006.

HAMAD, A.R.; MOHAMOOD, A.S.; TRUJILLO, C.J.; HUANG, C.T.; YUAN, E.; SCHNECK, J.P. B220+ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. **Immunol**. Vol. 1;171(5), p. 2421-2426. 2003.

HAYDAY, A.C.  $\gamma\delta$  CELLS: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection **Annu. Rev. Immunol**. Vol. 18, p. 975–1026. 2000.

HEWINSON, R.G. TB vaccines for the world. **Tuberculosis**. Vol. 85, p. 1-6. 2005.

HOSSAIN, M.S.; TAKIMOTO, H.; NINOMIYA, T.; YOSHIDA, H.; KISHIHARA, K.; MATSUZAKI, G.; KIMURA, G.; NOMOTO, K. Characterization of CD4- CD8- CD3+ T-cell receptor-alpha-beta+ T cells in murine cytomegalovirus infection. **Immunology**. Vol. 101(1), p. 19-29. 2000.

HOU, R.; GOLOUBEVA, O.; NEUBERG, D.S.; STROMINGER, J.L.; WILSON, S.B. Interleukin-12 and interleukin-2-induced invariant natural killer T-cell cytokine secretion and perforin expression independent of T-cell receptor activation. **Immunology**. Vol. 110, vol. 30-37. 2003.

IM, J.S.; KANG, T.J.; LEE, S.B.; KIM, C.H.; LEE, S.H.; VENKATASWAMY, M.M.; SERFASS, E.R.; CHEN, B.; ILLARIONOV, P.A.; BESRA, G.S.; JACOBS, W.R. JR.; CHAE, G.T.; PORCELLI, S.A. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections. **Clin Immunol**. Vol. 127(2), p. 214-224. 2008.

INOUE, M.; KANTO, T.; MIYATAKE, H.; ITOSE, I.; MIYAZAKI, M.; YAKUSHIJIN, T.; SAKAKIBARA, M.; *et al.* Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**. Vol. 45, p. 190–196. 2006.

ITO, M.; KOJIRO, N.; IKEDA, T.; ITO, T.; FUNADA, J.; KOKUBU, T. Increased proportions of peripheral blood gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. **Chest**. Vol. 102(1), p. 195-207. 1992.

JAMIL, B.; SHAHID, F.; HASAN, Z.; NASIR, N.; RAZZAKI, T.; DAWOOD, G.; HUSSAIN, R. Interferon gamma/IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**. Vol. 87(4), p. 279-287. 2007.

JASON, J.; BUCHANAN, I.; ARCHIBALD, L.K.; NWANYANNWU, O.C.; BELL, M.; GRENN, A.T.; EICK, A.; HAN, A.; RAZSI, D.; KAZEMBE, P.N.; DOBBIE, H.; MIDATHADA, M.; JARVIS, W.R. Natural T,  $\delta$ , and NK Cells in Mycobacterial, Salmonella, and Human Immunodeficiency Virus Infections. **J. Infections Disease**, v.182, p.474-48, 2000.

JIN, N.; TAUBE, C.; SHARP, L.; HAHN, Y.; YIN, X.; WANDS, J.M.; ROARK, C.L.; O'BRIEN, R.L.; GELFAND, E.W.; BORN, W.K. Mismatched Antigen Prepares  $\gamma\delta$ T Cells for Suppression of Airway Hyperresponsiveness. **J. Immunol.** Vol. 174, p. 2671-2679. 2005.

JO, E.K.; PARK, J.K.; DOCKRELL, H.M. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary Tuberculosis. **Current Opinion in Infectious Diseases.** Vol. 16, p. 205-210. 2003.

JUNG, Y.J.; LACOURSE, R.; RYAN, L.; NORTH, R.J. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. **Infect Immun.** Vol. 70(11), p. 6436-6443. 2002.

KABELITZ, D.; BENDER, A.; SCHONDELMAIER, S.; SCHOEL, B.; KAUFMANN, S.H. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. **J Exp Med.** Vol. 1;171(3), p. 667-679. 1990.

KABELITZ, D. Small molecules for the activation of human gammadelta T cell responses against infection. **Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.** Vol. 3(1), p. 1-9. 2008.

KADENA, T.; MATSUZAKI, G.; FUJISE, S.; KISHIHARA, K.; TAKIMOTO, H.; SASAKI, M.; BEPPU, M.; NAKAMURA, S.; NOMOTO, K. TCR alpha beta+ CD4-CD8- T cells differentiate extrathymically in an Ick-independent manner and participate in early response against Listeria monocytogenes infection through interferon-gamma production. **Immunology.** Vol. 91(4), p. 511-519. 1997.

KAPP, J.A.; KAPP, L.M.; MCKENNA, K.C. Gammadelta T cells play an essential role in several forms of tolerance. **Immunol Res.** Vol. 29(1-3), p. 93-102. 2004.

KAUFMANN, S.H.E. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. **Ann Rheum Dis.** Vol. 61(II), p. ii54-ii58. 2002.

KAUFMANN, S.H.E. New issues in tuberculosis. **Ann Rheum Dis.** Vol. 63(II), p. ii50-ii56. 2004.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. **Tuberculose: do Ambulatório à Enfermaria.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

KUO, H.; WANG, C.; HUANG, K.; LIN, H.; YU, C.; LIU, C.; LU, L. Nitric oxide modulates interleukin -  $1\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** vol. 161, p. 192-199. 2000.

LAZAREVIC, V.; FLYNN, J. CD8+T cells in tuberculosis. **Pulmonary Perspective.** vol.166, p.1116-1121. 2002.

LAZZARINI, L.C.; SPINDOLA, S.M.; BANG, H.; GIBSON, A.L.; WEISENBERG, S.; DA SILVA CARVALHO, W.; AUGUSTO, C.J.; HUARD, R.C.; KRITSKI, A.L.; HO, J.L. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Associated with a Higher Frequency of Cavitory Pulmonary Disease. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 46(7), p. 2175-2183. 2008.

LI, B.; ROSSMAN, M.D.; IMIR, T.; ONER-EYUBOGLU, A.F.; LEE, C.W.; BIANCANIELLO, R.; CARDING, S.R. Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. **J Immunol**. Vol. 1;157(9), p. 4222-4229. 1996.

LI, B.; BASSIRI, H.; ROSSMAN, M.D.; KRAMER, P.; EYUBOGLU, A.F.; TORRES, M.; SADA, E.; IMIR, T.; CARDING, S.R. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteriareactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. **J. Immunol**. Vol. 1;161(3), p. 1558-1567. 1998.

LI, L.; WU, C.Y. CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. **Blood**. Vol. 15;111(12) p. 5629-5636. 2008.

LIENHARDT, C.; AZZURRI, A.; AMEDEI, A. *et al.* Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. **Eur J Immunol**. Vol. 32, p. 1605-1613. 2002.

LIN, P.L.; PLESSNER, H.L.; VOITENOK, N.N.; FLYNN, J.L. Tumor necrosis factor and tuberculosis. **J Invest Dermatol Symp Proc**. Vol. 12(1), p. 22-25. 2007.

LIU, M.F.; LI, J.S.; WENG, T.H.; LEI, H.Y. Double-negative (CD4-CD8-) TCR alphabeta+ cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Scand J Rheumatol**. Vol. 27(2), p. 130-134. 1998.

LIU, M.F.; YANG, C.Y.; CHAO, S.C.; LI, J.S.; WENG, T.H.; LEI, H.Y. Distribution of double-negative (CD4- CD8-, DN) T subsets in blood and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**. Vol. 18(3), p. 227-231. 1999.

LIU, P.T.; MODLIN, R.L. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Opin Immunol**. Vol. 20(4), p. 371-376. 2008.

LONDEI, M.; VERHOEF, A.; DE BERARDINIS, P.; KISSONERGHIS, M.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; FELDMANN, M. Definition of a population of CD4-8- T cells that express the alpha beta T-cell receptor and respond to interleukins 2, 3, and 4. **Proc Natl Acad Sci USA**. Vol. 86(21), p. 8502-8506. 1989.

LOWRY, O.H; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem**. vol. 193, p. 265-275. 1951.

MANABE, Y.C.; BISHAI, W.R. Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. **Nat Med**. Vol. 6(12), p. 1327-1329. 2000.

MANFREDI, A.A.; HELTAI, S.; ROVERE, P.; SCIORATI, C.; PAOLUCCI, C.; GALATI, G.; RUGARLI, C.; VAIANI, R.; CLEMENTI, E.; FERRARINI, M. Mycobacterium tuberculosis exploits the CD95/CD95 ligand system of gamma delta T cells to cause apoptosis. **Eur J Immunol**. Vol. 28, p. 1798-1806. 1998.

MATHIOT, N.D.; KRUEGER, R.; FRENCH, M.A.; PRICE, P. Percentage of CD3+CD4-CD8-gammadelta TCR-T cells is increased HIV disease. **AIDS Res Hum Retroviruses**. Vol. 1;17(10), p. 977-980. 2001.

MATSUNAGA, I.; BHATT, A.; YOUNG, D.C.; CHENG, T.Y.; EYLES, S.J.; BESRA, G.S.; BRIKEN, V.; PORCELLI, S.A.; COSTELLO, C.E.; JACOBS, W.R. JR.; MOODY, D.B. Mycobacterium tuberculosis pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. **J Exp Med**. Vol. 20;200(12), p. 1559-1569. 2004.

MICELI, I.; DE KANTOR, I.N.; COLAIOVO, D.; PELUFFO, G.; CUTILLO, I.; GORRA, R.; *et al.* Evaluation of the effectiveness of BCG vaccination using the case-control method in Buenos Aires, Argentina. **Int J Epidemiol**. Vol. 17, p. 629-634. 1988.

MOHRAN, V.P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K.E.; TSANG, E.; TSAL, M.C.; FLYNN, J.L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect. Immun**. vol. 69, p. 1847-1855. 2001.

MONTOYA, C.J.; POLLARD, D.; MARTINSON, J.; KUMARI, K.; WASSERFALL, C.; MULDER, C.B.; RUGELES, M.T.; ATKINSON, M.A.; LANDAY, A.L.; WILSON, S.B. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. **Immunology**. Vol. 122, p. 1-14. 2007.

MONTOYA, C.J.; CATAÑO, J.C.; RAMIREZ, Z.; RUGELES, M.T.; WILSON, S.B.; LANDAY, A.L. Invariant NKT cells from HIV-1 or Mycobacterium tuberculosis-infected patients express an activated phenotype. **Clinical Immunology**. Vol. 127, p. 1-6. 2008.

MOODY, D.B.; REINHOLD, B.B.; GUY, M.R.; BECKMAN, E.M.; FREDERIQUE, D.E.; FURLONG, S.T.; YE, S.; REINHOLD, V.N.; SIELING, P.A.; MODLIN, R.L.; BESRA, G.S.; PORCELLI, S.A. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. **Science**. Vol. 10;278(5336), p. 283-286. 1997.

MOODY, D.B.; ULRICHS, T.; MÜHLECKER, W.; YOUNG, D.C.; GURCHA, S.S.; GRANT, E.; ROSAT, J.P.; BRENNER, M.B.; COSTELLO, C.E.; BESRA, G.S.; PORCELLI, S.A. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection. **Nature**. Vol. 20;404(6780), p. 884-888. 2000.

MOODY, D.B.; GUY, M.R.; GRANT, E.; CHENG, T.Y.; BRENNER, M.B.; BESRA, G.S.; PORCELLI, S.A. CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. **J Exp Med**. Vol. 2;192(7), p. 965-976. 2000.

MOREAU, J.F.; TAUPIN, J.L.; DUPON, M.; CARRON, J.C.; RAGNAUD, J.M.; MARIMOUTOU, C.; BERNARD, N.; CONSTANS, J.; TEXIER-MAUGEIN, J.; BARBEAU, P.; JOURNOT, V.; DABIS, F.; BONNEVILLE, M.; PELLEGRIN, J.L. Increases in CD3+CD4-CD8- T lymphocytes in AIDS patients with disseminated Mycobacterium avium-intracellulare complex infection. **J Infect Dis**. Vol. 174(5), p. 969-976. 1996.

MORITA, C.T.; JIN, C.; SARIKONDA, G.; WANG, H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. **Immunol Rev**. vol. 215, p. 59-76. 2007.

MOSER, B.; EBERL, M. Gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. **Immunol Rev**. vol. 215, p. 89-102. 2007.

NANNO, M.; SHIOHARA, T.; YAMAMOTO, H.; KAWAKAMI, K.; ISHIKAWA, H. Gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. **Immunol Rev**. vol. 215, p. 103-113. 2007.

NICOD, L. P. Immunology of tuberculosis. **Swiss Med Wkly**. vol. 137, p. 357-362. 2007.

NIEHUES, T.; EICHELBAUER, T.; SCHNEIDER, E.M. Functional Characteristics of Human Peripheral Blood  $\alpha/\beta$  TCR+, CD4- and CD8- Double-Negative (DN) T Cells. **Microbiol. Immunol**. Vol. 43(2), p. 153-159. 1999.

NORTH, R.J.; JUNG, Y.J. Immunity to tuberculosis. **Annu Rev Immunol**. Vol. 22, p. 599-623. 2004.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. **Crit. Care Med**. vol. 28, p. 3-12, 2000.

OTTONES, F. ; DORNAND, J. ; NAROENI, A. ; LIAUTARD, J.P. ; FAVERO, J. V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of Brucella suis in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect. **J Immunol**. Vol. 15;165(12), p. 7133-7139. 2000.

PEREIRA, S.M.; DANTAS, O.M.; XIMENES, R.; BARRETO, M.L. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. **Rev Saúde Pública**. Vol. 41(1), p. 59-66. 2007.

POGGI, A.; CATELLANI, S.; FENOGLIO, D.; BORSELLINO, G.; BATTISTINI, L.; ZOCCHI, M.R. Adhesion molecules and kinases involved in gammadelta T cells migratory pathways: implications for viral and autoimmune diseases. **Curr Med Chem**. Vol. 14(30), p. 3166-3170. 2007.

PORCELLI, S.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. **Nature**. Vol. 10;360(6404), p. 593-597. 1992.

RAJAVELU, P.; DAS, S.D. Expression of co-stimulatory molecules B7.1 & B7.2 on macrophages infected with various strains of *Mycobacterium tuberculosis* & its influence on T-cell apoptosis. **Indian J Med Res.** Vol. 127(4), p. 388-394. 2008.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H.E. Immune responses to intracellular bacteria. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 417-428, 2001.

REIBMAN, J.; ROM, W.; LOPEZ-RAMIREZ, G.; TALBOT, A.; JAGIRDAR, J.; Expression of antigen presentig cells (APCs) and costimulatory molecules (ICAM-1, B7-1) in humana granuloma formed in response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Am J. Respir Crit Care Med.** p. 115-131. 1996.

REIMANN, J. Double-negative (CD4-CD8-), TCR alpha beta-expressing, peripheral T cells. **Scand J Immunol.** Vol. 34(6), p. 679-688. 1991.

RHODES, S.G.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Antigen recognition and immunomodulation by gamma delta T cells in bovine tuberculosis. **J Immunol.** Vol. 1;166(9), p. 5604-5610. 2001.

RINCON-OROZCO, B.; KUNZMANN, V.; WROBEL, P.; KABELITZ, D.; STEINLE, A.; HERRMANN, T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. **J Immunol.** Vol. 15;175(4), p. 2144-2151. 2005.

RODEN, A.C.; MORICE, W.G.; HANSON, C.A. Immunophenotypic attributes of benign peripheral blood gammadelta T cells and conditions associated with their increase. **Arch Pathol Lab Med.** vol. 132(11), p. 1774-1780. 2008.

RODRIGUES, D.S.S.; MEDEIROS, E.A.; WECKX, L.Y.; BONEZ, W.; SALOMÃO, R. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. **Clinical and Exper. Immunol.** vol. 128, p.149-154, 2002.

RODRIGUES, L.C.; DIWAN, V.K.; WHEELER, J.G. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analyse. **Int J Epidemiol.** Vol. 22(6), p. 1154-1168. 1993.

RODRIGUES, L.C.; PEREIRA, S.M.; CUNHA, S.S.; GENSER, B.; ICHIHARA, M.Y.; DE BRITO, S.C.; *et al.* Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in schoolaged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster randomised trial. **Lancet.** Vol. 366, p. 1290-1295. 2005.

ROJAS, M.; OLIVIER, M.; GROS, P.; BARRERA, L.F.; GARCÍA, L.F. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **J Immunol.** Vol. 15;162(10), p. 6122-6131. 1999.

ROMANUS V. Selective BCG vaccination in a country with low incidence of tuberculosis. **Euro Surveill.** Vol. 11, p. 14-17. 2006.

ROSENTHAL, S.R.; LOEWINSOHN, E.; GRAHAM, M.L.; LIVERIGHT, D.; THORNE, G.; JOHNSON, V. BCG vaccination against tuberculosis in Chicago. A twenty-year study statistically analyzed. **Pediatrics**. Vol. 1;28, p. 622-641. 1961.

RUSSANO, A.M.; AGEA, E.; CORAZZI, L.; POSTLE, A.D.; DE LIBERO, G.; PORCELLI, S.; DE BENEDECTIS, F.M.; SPINOZZI, F. Recognition of pollen-derived phosphatidyl-ethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells. **J Allergy Clin Immunol**. Vol. 117(5), p. 1178-1184. 2006.

SAHIRATMADJA, E.; ALISJAHBANA, B.; DE BOER, T.; ADNAN, I.; MAYA, A.; DANUSANTOSO, H.; NELWAN, R.H.; MARZUKI, S.; VAN DER MEER, J.W.; VAN CREVEL, R.; VAN DE VOSSE, E.; OTTENHOFF, T.H. Dynamic Changes in Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Profiles and Gamma Interferon Receptor Signaling Integrity Correlate with Tuberculosis Disease Activity and Response to Curative Treatment. **Infect Immun**. Vol. 75(2), p. 820-829. 2007.

SALIU, O.Y.; SOFER, C.; STEIN, D.S.; SCHWANDER, S.K.; WALLIS, R.S. Tumor-Necrosis-Factor Blockers: Differential Effects on Mycobacterial Immunity. **J Infect Dis**. Vol. 15;194(4), p. 486-492. 2006.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E.M.; REIS, D.D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; ANTAS, P.R.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S.M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scand J Immunol**. Vol. 58, p. 655-663. 2003.

SCHLUGER, N.W. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. **Respiratory-Research**. vol. 2, n.3, p.157-163. 2001.

SERBINA, N.V.; FLYNN, J. CD8+ T Cells participate in the memory immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**. vol. 69, p. 4320-4328. 2001.

SHARMA, S.K.; MITRA, D.K.; BALAMURUGAN, A.; PANDEY, R.M. Cytokine polarization in miliary and pleural tuberculosis. **J. Clin Immunol**. Vol. 22, p. 345-352. 2002.

SHEN, Y.; ZHOU, D.; QIU, L.; LAI, X.; SIMON, M.; SHEN, L.; KOU, Z.; WANG, Q.; JIANG, L.; ESTEP, J.; HUNT, R.; CLAGETT, M.; SEHGAL, P.K.; LI, Y.; ZENG, X.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B.; LETVIN, N.L.; CHEN, Z.W. Adaptive immune response of Vgamma2 Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. **Science**. Vol. 22;295(5563), p. 2255-2258. 2002.

SIELING, P.A.; PORCELLI, S.A.; DUONG, B.T.; SPADA, F.; BLOOM, B.R.; DIAMOND, B.; *et al*. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. **J Immunol**. Vol. 165(9), p. 5338-5344. 2000.

SKOBERNE, M.; MALOVRH, T.; SKRALOVNIK-STERN, A.; KOTNIK, V. Human peripheral blood lymphocytes sensitised to PPD respond to in vitro stimulation with

increased expression of CD69 and CD134 activation antigens and production of Th-1 type cytokines. **Pflugers Arch.** Vol. 440(5), p. 58-60. 2000.

SPADA, F.M.; GRANT, E.P.; PETERS, P.J.; SUGITA, M.; MELIÁN, A.; LESLIE, D.S.; LEE, H.K.; VAN DONSELAAR, E.; HANSON, D.A.; KRENSKY, A.M.; MAJDIC, O.; PORCELLI, S.A.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. **J Exp Med.** vol. 20;191(6), p. 937-948. 2000.

STENGER, S.; MAZZACCARO, R.J.; UYEMURA, K.; CHO, S.; BARNES, P.F.; ROSAT, J.P.; SETTE, A.; BRENNER, M.B.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. **Science.** Vol. 13;276(5319), p. 1684-1687. 1997.

STENGER, S.; MODLIN, R.L. T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Current Opinion in Microbiology.** Vol. 2, p. 89-93. 1999.

TAKAHASHI, T.; CHIBA, S.; NIEDA, M.; AZUMA, T.; ISHIHARA, S.; SHIBATA, Y.; *et al.* Cutting edge: analysis of human V alpha 24 + CD8 + NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocytederived dendritic cells. **J Immunol.** Vol. 168, p. 3140-3144. 2002.

TAN, J.S.; CANADAY, D.H.; BOOM, W.H.; BALAJI, K.N.; SCHWANDER, S.K.; RICH, E.A. Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. **J Immunol.** Vol. 1;159(1), p. 290-297. 1997.

TANAKA, Y.; MORITA, C.T.; TANAKA, Y.; NIEVES, E.; BRENNER, M.B.; BLOOM, B.R. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. **Nature.** Vol. 11;375(6527), p. 155-158. 1995.

TESTI, R.; D'AMBROSIO, D.; DE MARIA, R.; SANTONI, A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. **Immunol Today.** Vol. 15, p. 479-483. 1994.

THOMSON, C.W.; LEE, B.P.; ZHANG, L. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. **Immunol Res.** Vol. 35(1-2), p. 163-178. 2006.

THOMSEN, H.; IVANYI, J.; ESPITIA, C.; ARYA, A.; LONDEI, M. Human CD4-CD8-alpha beta + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b. **Immunology.** Vol. 85(1), p. 33-40. 1995.

TRUNZ, B.B.; FINE, P.E.M.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **Lancet.** Vol. 367, p. 1173-1180. 2006.

TSICOPOULOS, A.; HAMID, Q.; VARNEY, V.; YING, S.; MOQBEL, R.; DURHAM, S.R.; KAY, A.B. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. **J. Immunol.** Vol. 148, p. 2058-2061. 1992.

TSUKAGUCHI, K.; DE LANGE, B.; BOOM, W.H. Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alphabetaTCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis-H37Ra. **Cell Immunol.** Vol. 25;194(1), p. 12-20. 1999.

UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KAWASUMI, H.; TAKASHIMA, T.; TOBA, H.; KISHIMOTO, S. Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. **Infect Immun.** Vol. 62(12), p. 5434-5441. 1994.

VAN PINXTEREN, L.A.; CASSIDY, J.P.; SMEDEGAARD, B.H.; AGGER, E.M.; ANDERSEN, P. Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. **Eur J Immunol.** Vol. 30(12), p. 3689-3698. 2000.

VIEY, E.; FROMONT, G.; ESCUDIER, B.; MOREL, Y.; DA ROCHA, S.; CHOUAIB, S.; CAIGNARD, A. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. **J Immunol.** Vol. 1;174(3), p. 1338-1347. 2005.

VON LILIENFELD-TOAL, M.; NATTERMANN, J.; FELDMANN, G.; SIEVERS, E.; FRANK, S.; STREHL, J.; SCHMIDT-WOLF, I.G. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. **Clin Exp Immunol.** Vol. 144(3), p. 528-533. 2006.

VROOM, T.M.; SCHOLTE, G.; OSSENDORP, F.; BORST, J. Tissue distribution of human gamma delta T cells: no evidence for general epithelial tropism. **J Clin Pathol.** Vol. 44(12), p. 1012-1017. 1991.

Wallis, R.S. Reactivation of latent tuberculosis by TNF blockade: the role of interferon gamma. **J Invest Dermatol Symp Proc.** Vol. 12(1), p. 16-21. 2007.

WANG, C.H.; LIN, H.C.; HUANG, T.T.; YU, C.T.; KUO, H.P. Upregulation of inducible nitric oxide and cytokine secretion in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. **Tuber. Lung Dis.**, v. 5, p. 283-291, 2001.

WANG, L.; DAS, H.; KAMATH, A.; BUKOWSKI, J.F. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. **J Immunol.** Vol. 1;167(11), p. 6195-6201. 2001.

WATTERSON, S.A.; DROBNIEWSKI, F.A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. **J. Clin. Pathol.** vol. 53, p. 727-732. 2000.

WENDLAND, T.; HERREN, S.; YAWALKAR, N.; CERNY, A.; PICHLER, W.J. Strong alpha beta and gamma delta TCR response in a patient with disseminated Mycobacterium avium infection and lack of NK cells and monocytopenia. **Immunol. Lett.** Vol. 1;72(2), p. 75-82. 2000.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis programme and global programme on vaccines. Statement on BCG revaccination for the prevention of tuberculosis. **Wkly Epidemiol Rec.** vol. 70, p. 229-231. 1995.

WHO. World Health Organization. The global Plan to Stop TB 2006-2005. Geneva:WHO; 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2008 Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008 WHO/HTM/TB/2008.393. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/download\\_centre/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/download_centre/en/index.html) acesso em 28/01/2009.

WORKALEMAHU, G.; FOERSTER, M.; KROEGEL, C. Expression and synthesis of fibroblast growth factor-9 in human gammadelta T-lymphocytes. Response to isopentenyl pyrophosphate and TGF-beta1/IL-15. **J Leukoc Biol**. Vol. 75(4), p. 657-663. 2004.

WORKALEMAHU, G.; FOERSTER, M.; KROEGEL, C. Expression of metalloproteinase-7 (matrilysin) in human blood and bronchoalveolar gamma/delta T-lymphocytes. Selective upregulation by the soluble non-peptidic mycobacterial phosphoantigen (isopentenyl pyrophosphate). **J Cell Physiol**. Vol. 207(1), p. 67-74. 2006.

YOSHIDA, N. Role of gamma/delta T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. **Kurume Medical Journal**. Vol. 48(2), p. 175-181. 2001.

ZHANG, Z.X.; YANG, L.; YOUNG, K.J.; DUTEMPLE, B.; ZHANG, L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. **Nat Méd**. Vol. 7, p. 782-789. 2000.

ZHANG, Z.X.; YOUNG, K.; ZHANG, L. CD3+CD4-CD8-  $\alpha\beta$ -TCR+ T cell as immune regulatory cell. **J Mol Med**. vol. 79, p. 419-427. 2001.

ZOCCHI, M.R.; POGGI, A. Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense. **Front Biosci**. Vol. 1;9, p. 2588-2604. 2004.

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

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

**Parecer nº. ETIC 095/08**

**Interessado(a): Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo**  
**Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**  
**Faculdade de Farmácia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 23 de junho de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do potencial imunorregulador de células T (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  de pacientes com formas graves da tuberculose" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

Obs.: alterar o Título de: Consentimento Pós-Informação para: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**ANEXO B - Termo de Consentimentos Livre e Esclarecido****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Faculdade de Farmácia  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Título do Projeto:

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNORREGULADOR DE CÉLULAS T (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  E  $\gamma\delta$  DE PACIENTES COM FORMAS GRAVES DA TUBERCULOSE.”**

---

**DESCRIÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA****OBJETIVO:**

O objetivo deste projeto é avaliar a resposta do nosso organismo contra o germe que causa a tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), em pacientes com sintomas clínicos e em indivíduos portadores do germe, porém sem exibir sinais clínicos da doença, visando conhecer a resposta de seu organismo (mecanismos imunológicos) responsáveis pela cura. A análise das alterações das respostas protetoras ocorridas em cada um desses grupos, poderá levar a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de cura da tuberculose, permitindo que futuros tratamentos mais específicos (baseados no estímulo de uma resposta imune celular específica) sejam desenvolvidos de modo a minimizar a multi-resistência às drogas e abreviar o curso do tratamento.

**PROCEDIMENTOS:**

Se você está doente, vamos coletar o seu sangue, um volume de 25 ml (4 tubos de sangue), para acompanhamento da evolução da doença antes de se iniciar o tratamento e ao final deste. No hospital, você será tratado até que seja considerado curado da tuberculose. A sua participação no estudo não requer visitas adicionais à clínica. Se você é saudável, não ao teste intradérmico (PPD), também vamos coletar o seu sangue, em volume idêntico, para que possamos ter um controle para o grupo com a tuberculose ativa.

**RISCOS/DESCONFORTOS:**

A punção venosa para coleta de sangue causa leve dor local. Poderá haver formação de um arroxamento e inchaço (hematoma e edema) no local e discreto sangramento.

**BENEFÍCIOS:**

Não há nenhum benefício direto para a sua participação. Porém, esperamos que este estudo ajude-nos a conhecer a resposta de seu organismo (mecanismos imunológicos) responsável pela cura, podendo advir benefícios como o desenvolvimento de novas drogas e/ou vacinas que possam melhorar significativamente a proteção do ser humano contra a tuberculose (ativar especificamente determinado ramo da resposta imune que tenhamos demonstrado ser importante no processo de cura da tuberculose pulmonar).

**PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS:**

Considerando que o vírus que causa a AIDS prejudica seu sistema imune e dessa forma inviabilizando o presente estudo, torna-se necessária a realização de testes anti-HIV para os casos em que os mesmo ainda não tiverem sido realizados no âmbito ambulatorial. Assim esses exames sorológicos serão realizados no laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Esses testes somente serão realizados mediante sua autorização prévia assinalada abaixo:

- ( ) Não autorizo que este teste seja realizado;  
 ( ) Autorizo e permito que este teste seja realizado desde que respeitados os meus direitos à privacidade e sigilo das informações

Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você pode desistir de participar a qualquer momento.

A sua não participação neste estudo não irá interferir no seu tratamento, ou seja, você receberá o tratamento adequado mesmo que não queira participar deste estudo. Isto não trará prejuízo à continuação de seu cuidado na clínica.

Você pode perguntar ao investigador principal mencionado abaixo, qualquer questão relacionada ao estudo. Os pesquisadores se comprometem a proporcionar informação sobre os resultados dos exames realizados ao final do estudo (aproximadamente dois anos).

#### CONFIDENCIALIDADE:

Toda informação obtida sobre você será mantida em poder do pesquisador principal. Apenas pessoas envolvidas no estudo terão acesso à estas informações. Dados de identificação pessoal serão removidos dos questionários e guardados em arquivos separados. Dentro dos limites da lei, todo esforço será feito no sentido de manter a confidencialidade das informações.

Se você desejar conversar sobre o estudo, ou achar que não foi bem tratado ou foi, por alguma razão prejudicado, você deve entrar em contacto com o investigador principal, Professor Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo no telefone: 0xx-31-3409-6876, ou ainda poderá contactar-se com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP pelo telefone: 0xx-31-3409-4592.

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

-----

Assinatura do Voluntário ou  
 Responsável Legal (se voluntário menor de 18 anos)

-----

Assinatura da Testemunha

-----

Assinatura do Pesquisador

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

(02 vias)

## ANEXO C - Ficha clínica do paciente

### QUESTIONÁRIO: GRUPO DE PESQUISA EM MICOBACTERIOSES

#### IDENTIFICAÇÃO

1. Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 2. Assinatura: \_\_\_\_\_  
 5. Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 6. Idade: \_\_\_\_\_ anos.  
 7. Nome da Mãe: \_\_\_\_\_  
 8. Naturalidade: \_\_\_\_\_  
 9. Estado: \_\_\_\_\_  
 10. Endereço: \_\_\_\_\_  
 11. Telefone: \_\_\_\_\_ 12. Celular: \_\_\_\_\_  
 13. Sexo:  
     0. ( ) Masculino 1. ( ) Feminino  
 14. Raça/IBGE declarada:  
     0. ( ) Branca; 1. ( ) Preta; 2. ( ) Parda; 3. ( ) Amarela; 4. ( ) Indígena; 5. ( ) Outra;  
 15. Raça/IBGE julgada pelo entrevistador:  
     0. ( ) Branca; 1. ( ) Preta; 2. ( ) Parda; 3. ( ) Amarela; 4. ( ) Indígena; 5. ( ) Outra;  
 16. Estado civil:  
     0. ( ) Casado; 1. ( ) Solteiro; 2. ( ) Relação estável; 3. ( ) Separado; 4. ( ) Desquitado/divorciado;  
     5. ( ) Viúvo; 6. ( ) Outro  
 17. Local de residência nos 2 últimos anos: \_\_\_\_\_  
 18. Renda Familiar:  
     0. ( ) até meio SM; 1. ( ) de meio a 1 SM; 2. ( ) de 1 a 2 SM; 3. ( ) de 2 a 3 SM; 4. ( ) de 3 a 5 SM; 5. ( ) de 5 a 10 SM; 6. ( ) de 10 a 20 SM; 7. ( ) mais de 20 SM; 8. ( ) não sabe;  
 19. Escolaridade:  
     0. ( ) analfabeto; 1. ( ) ensino fundamental incompleto; 2. ( ) ensino fundamental completo; 3. ( ) ensino médio incompleto; 4. ( ) ensino médio completo; 5. ( ) ensino superior incompleto; 6. ( ) ensino superior completo; 7. ( ) pós-graduação.  
 20. Ocupação e/ou profissão: \_\_\_\_\_

- 
21. Gravidez ( ) Não ( ) Sim  
 22. Lactação ( ) Não ( ) Sim  
 23. Cicatriz vacinal: ( ) Não ( ) Sim. Quantas? \_\_\_\_\_  
 24. Tipo de TB: ( ) pulmonar ( ) extrapulmonar. Especificar: \_\_\_\_\_  
 25. TB anterior: ( ) Não ( ) Sim. Tipo: \_\_\_\_\_  
 26. Contato recente ( ) Não ( ) Sim  
 27. Contactante - Nome: \_\_\_\_\_  
 28. Alcoolismo: ( ) Não ( ) Sim. Aplicar o teste de CAGE (em anexo).  
 29. HIV: ( ) Não ( ) Sim ( ) NR  
 30. Tabagista ( ) Não ( ) Sim. Maços/ano: \_\_\_\_\_  
 31. IRC: ( ) Não ( ) Sim  
 32. Hepatopatia: ( ) Não ( ) Sim  
 33. Diabetes: ( ) Não ( ) Sim  
 34. Silicose: ( ) Não ( ) Sim  
 35. Sarcoidose: ( ) Não ( ) Sim  
 36. Linfoma: ( ) Não ( ) Sim  
 37. Uso de drogas ilícitas: ( ) Não ( ) Sim. Qual(is)? \_\_\_\_\_  
 38. Uso de corticóides: ( ) Não ( ) Sim  
 39. Uso de imunossupressores: ( ) Não ( ) Sim  
 40. Doença de autoimunidade: ( ) Não ( ) Sim  
 41. Infecção virótica ( ) Não ( ) Sim. Qual? \_\_\_\_\_
- 

#### CLÍNICA

42. Início dos sintomas: \_\_\_\_\_  
 43. Tosse: ( ) Não ( ) Sim  
 44. Expectoração: ( ) Não ( ) Sim  
 45. Hepotise/hemoptoicos: ( ) Não ( ) Sim  
 46. Dispneia: ( ) Não ( ) Sim

47. Dor torácica:  Não  Sim  
 48. Cianose:  Não  Sim  
 49. Chieira:  Não  Sim  
 50. Febre:  Não  Sim  
 51. Adinamia:  Não  Sim  
 52. Anorexia:  Não  Sim  
 53. Sudorese noturna:  Não  Sim  
 54. Emagrecimento:  Não  Sim
- Peso: \_\_\_\_\_ Kg

## EXAMES LABORATORIAS

55. RX de tórax inicial: \_\_\_\_\_  
 - Acometimento pulmonar (zonas):  Superior  Médio  Inferior  
 - Formas:  Até 2 zonas forma leve (L)  De 2 a 4 zonas forma moderada (M)  De 5 ou mais zonas forma extensa (E)  
 56. TC torax: \_\_\_\_\_  
 57. 1° PPD:  Pos  Neg 2° PPD:  Pos  Neg 3° PPD:  Pos  Neg  
 58. Baciloscopia:  Neg  Pos  
 59. Cultura:  Neg  Pos

HISTOPATOLOGICO: \_\_\_\_\_

TI: \_\_\_\_\_

TS: \_\_\_\_\_

Testes imunológicos: \_\_\_\_\_

Testes moleculares: \_\_\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)