

**Tese de Doutorado**



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
E SAÚDE PÚBLICA**

**BRUNA DANIELLA DE SOUZA SILVA**

---

**Avaliação da resposta imune específica de células TCD8+ e  
citocinas na tuberculose humana**

---

**Goiânia  
2015**

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      [ ] **Dissertação**      [X] **Tese**

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Bruna Daniella de Souza Silva		
E-mail:	bruna.daniella@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	[ X ] Sim	[ ] Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ: 00.889.834/0001-08
Título:	Avaliação da resposta imune específica de células TCD8+ e citocinas na tuberculose humana		
Palavras-chave:	Tuberculose; Células TCD8+; Citometria de fluxo; Baciloscopia; Tuberculose cutânea.		
Título em outra língua:	Evaluation of specific immune response of TCD8+ cells and cytokines in human tuberculosis		
Palavras-chave em outra língua:	Tuberculosis; TCD8+ cells; Flow cytometry; Bacillary load; Cutaneous tuberculosis.		
Área de concentração:	Imunologia		
Data defesa:	13/02/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador (a):	Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis		
E-mail:	<a href="mailto:apkipnis@gmail.com">apkipnis@gmail.com</a>		
Co-orientador (a):*	Prof. Dr. André Kipnis		
E-mail:	<a href="mailto:akipnis@gmail.com">akipnis@gmail.com</a>		

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [ X ] SIM      [ ] NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 07 / 12 / 2015

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**BRUNA DANIELLA DE SOUZA SILVA**

---

**Avaliação da resposta imune específica de células TCD8+ e  
citocinas na tuberculose humana**

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis  
Co-orientador: Prof. Dr. André Kipnis

**Goiânia  
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Silva, Bruna Daniella de Souza

Avaliação da resposta imune específica de células TCD8+ e citocinas na tuberculose humana [manuscrito] / Bruna Daniella de Souza Silva. - 2015.

CX, 110 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis; co-orientador Dr. André Kipnis.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Tuberculose. 2. Células TC8+. 3. Citometria da Fluxo. 4. Baciloscopia. 5. Tuberculose cutânea. I. Junqueira-Kipnis, Dra. Ana Paula, orient. II. Kipnis, Dr. André, co-orient. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno (a): Bruna Daniella de Souza Silva**

---

**Orientador (a): Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis**

---

**Co-orientador (a): Prof. Dr. André Kipnis**

---

**Membros:**

**1. Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Junqueira Kipnis – IPTSP/UFG**

**2. Profa. Dr<sup>a</sup>. Anamélia Lorenzetti Bocca – UnB/DF**

**3. Profa. Dr<sup>a</sup>. Menira Borges de Lima Dias e Souza – IPTSP/UFG**

**4. Profa. Dr<sup>a</sup>. Simone Gonçalves da Fonseca – IPTSP/UFG**

**5. Profa. Dr<sup>a</sup>. Mariane Martins de Araújo Stefani – IPTSP/UFG**

**Data: 13/02/2015**

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.  
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.*  
*(Mahatma Gandhi)*

*À minha mãe, Maria José de Souza Silva,  
pessoa mais importante da minha vida.*

## *Agradecimentos*

*Agradeço imensamente a minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis por não ter desistido de mim, por acreditar no meu trabalho me dando a chance de desvendar os caminhos da ciência, me guiando nessa longa jornada. Minha eterna gratidão pela confiança depositada em mim desde o princípio, da qual, muitas vezes nem eu mesma acreditava ser capaz. O ensinamento do que é ser uma pesquisadora será eternamente solidificado em mim e levarei comigo por toda a minha vida acadêmica. Agradeço também ao meu co-orientador Prof. Dr. André Kipnis por estar ali sempre presente quando mais precisava, auxiliando nas etapas críticas do trabalho e sempre conduzindo sabiamente as coisas da melhor maneira possível. Vocês são muito mais do que um belo casal que serve de exemplo para todos nós e que admiro muito como pais e companheiros. Vocês são a essência da ciência e possuem o dom de fazer da pesquisa científica muito mais do que um simples artigo publicado, vocês fazem dela o combustível da vida para enriquecer a alma do nosso conhecimento. Sem vocês com certeza eu não teria chegado até aqui. Vocês foram os responsáveis pela realização de mais essa conquista e eu agradeço infinitamente, por tudo.*

*À minha amada família: minha mãe Maria José de Souza Silva e meu pai Lázaro Alves de Souza (in memoriam) por terem me proporcionado a existência e por terem me ensinado que a única coisa que ninguém pode tirar de você é o conhecimento. Foi por vocês que eu cheguei até aqui e me tornei a pessoa que sou hoje. Minha eterna gratidão! Meu maninho querido Denner Douglas Silva de Souza e minha cunhada Thatianna da Silva Franco por me ampararem nos momentos difíceis da vida, pelos sábios conselhos durante as indecisões e por serem um grande exemplo de vida para mim. Aos meus irmãos de coração Cleubmar Vieira de Souza e Aline Daiana Serria Matos por entenderem a minha ausência e sempre me apoiarem.*

*Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas e do Laboratório de Bacteriologia Molecular André Amaral, Beatriz Fonseca, Bruno Santos, Danilo Resende, Fábio Muniz, Luana Nice, Rafaela Alves, Renato Builder, Rogério Coutinho, Sarah Nogueira, Viviane Lopes e todos aqueles que passaram pelo laboratório dividindo comigo conhecimento e por me proporcionarem momentos únicos na pesquisa. Mas agradeço especialmente ao Abadio Junior, a*

*Adeliane Costa, a Duanne Alves, ao Lazaro Neto e a Monalisa Trentini por todas as experiências e aprendizados divididos, pelo apoio nos momentos críticos desta etapa, por sempre acreditarem em mim e fazerem com que eu também acreditasse, por me ouvirem e por serem mais que meus colegas de laboratório, por serem meus AMIGOS. Abadio, Duanne e Mona, vocês foram os irmãos que ganhei durante o doutorado e agradeço do fundo da minha alma por realmente fazerem a diferença em minha vida.*

*Não poderia deixar de agradecer ao Sr. Luis e a Dona Sílvia, pais da minha amiga Duanne, que me acolheram como sua filha no Rio de Janeiro durante o desenvolvimento dos ensaios de Multiplex na FIOCRUZ. E ao Igor, mais novo amigo, que me proporcionou momentos especiais de descontração em meio ao turbilhão de tarefas a serem realizadas. Obrigada por amenizarem as dificuldades durante esse momento e por cuidarem de mim com tanto carinho e dedicação. Vocês são muito especiais!*

*Agradeço às minhas amigas Adriana Rocha do Nascimento, Ana Maria Damasceno, Evely Mayre da Silva, Kelly Kronbauer Kunrath, Priscilla Roriz Bueno e Thalita Rodrigues Amorim pelos momentos de descontração e apoio durante os períodos difíceis que passei no decorrer dessa jornada.*

*Ao Felipe Amaral pelo companheirismo, carinho e paciência durante todos os momentos desde o dia em que te conheci.*

*Agradeço às professoras doutoras: Simone Fonseca, Patrícia Loyola e Ludmilla Cardoso por todas as contribuições neste trabalho durante o exame de qualificação.*

*À banca de defesa, professores doutores: Anamélia Bocca, Menira Dias e Souza, Simone Fonseca e Mariane Stefani e aos suplentes professores doutores: Aldo Tavares, Patrícia Loyola, Keila Alcântara e Maria Cláudia André por aceitarem participar da minha banca de defesa e contribuírem para o aprimoramento desse trabalho.*

*Agradeço a FIOCRUZ e a Rede de Plataformas Tecnológicas Lumínex pela oportunidade de aprendizado e pela disponibilidade em nos atender tão prontamente, especialmente ao técnico em laboratório Edson Fernandes de Assis pelos ensinamentos e por ser tão prestativo durante os ensaios de multiplex na FIOCRUZ/RJ.*

*Agradeço ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FARMATEC/UFJF) pelo suporte técnico com a citometria de fluxo.*

*Agradeço a todos os médicos que nos auxiliaram no recrutamento dos pacientes para este estudo, Andréia, Pedro, Adriana, Petronor Fonseca, César, em especial ao João Alves, ao*

*Marcelo Rabahi e a Daniela Tannus por contribuírem também cientificamente.*

*Agradeço a todos os funcionários das unidades de saúde do Hospital das Clínicas, Hospital de Doenças Tropicais e CAIS Nova Era por toda a ajuda prestada durante o recrutamento dos pacientes, em especial as enfermeiras Queílíene Santos do CAIS Nova Era e Aline Sampaio Bello do Programa de Controle da Tuberculose da Secretaria Estadual da Saúde pelo fornecimento de dados referentes à epidemiologia da tuberculose em Goiás e Goiânia, por estarem sempre dispostas a ajudar e darem atenção maior a essa etapa de realização desse trabalho.*

*Aos meus queridos chefes e amigos: Maria Helena Romeiro, Valter Bonfim, Jorgemar Jerônimo e Tereza Resende por me darem total apoio e garantirem meu tempo para realização e finalização deste trabalho durante os árduos plantões na papiloscopia. À todos os colegas de trabalho, por me apoiarem incondicionalmente.*

*Agradeço ao apoio da CAPES, CNPq e FUNAPE pelo financiamento das pesquisas.*

*Agradeço a todos os professores e funcionários do IPTSP/UFG que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.*

*E, por tudo o que aconteceu durante esse período na minha vida, por todas essas pessoas, por tudo o que Ele fez e pelo que ainda vai fazer, eu agradeço a Deus. “Pois à Ele honra e glória eternamente”.*

## SUMÁRIO

---

<i>Agradecimentos</i> .....	8
SUMÁRIO .....	11
TABELAS, FIGURAS, QUADROS E ANEXOS .....	12
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	19
2.2 Epidemiologia.....	22
2.3 Imunopatologia da tuberculose.....	23
2.4 Tuberculose infecção latente .....	32
2.5 Diagnóstico da tuberculose.....	34
3. JUSTIFICATIVA .....	37
4. OBJETIVOS .....	38
4.1 Objetivo Geral: .....	38
4.2 Objetivos específicos: .....	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
5.1 População de estudo.....	39
5.2 Realização da prova tuberculínica .....	39
5.3 Coleta das amostras .....	40
5.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico .....	40
5.5 Antígeno Protéico .....	41
5.6 Cultura e estimulação das células .....	41
5.7 Citometria de fluxo de células TCD8+ .....	42
5.9 ELISA para detecção de IL-6 .....	45
5.10 Análise Estatística.....	45
6. RESULTADOS .....	46
Artigo 1 – Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis.....	46
Artigo 2 – Late diagnosis and TCD8 immune response profile of cutaneous tuberculosis: A case report.....	46
7. DISCUSSÃO .....	77
8. CONCLUSÕES .....	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
10. ANEXOS .....	101
<b>Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética dos pacientes com tuberculose e controles sadios</b> .....	101
<b>Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes com tuberculose e controles sadios</b> .....	102
<b>Anexo 3 - Questionário dos pacientes com tuberculose e controles sadios</b> .....	104

## TABELAS, FIGURAS, QUADROS E ANEXOS

---

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo da estrutura e dos constituintes celulares do granuloma formado em uma infecção por Mtb.....	<b>26</b>
<b>Quadro 1.</b> Anticorpos utilizados na citometria de fluxo para marcação celular após cultura de 96h .....	<b>44</b>
<b>Quadro 2.</b> Anticorpos utilizados na citometria de fluxo para marcação celular <i>ex vivo</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 2.</b> Exemplos de <i>Dot Plots</i> de citometria de fluxo representando a análise das subpopulações funcionais de linfócitos TCD8+ em um paciente com tuberculose pulmonar ativa. ....	<b>45</b>

### Artigo 1

<b>Table 1.</b> Characteristics of subjects .....	<b>55</b>
<b>Figure 1.</b> Analysis of CD8+ T cells expressing IFN- $\gamma$ and IL-17 and plasma levels of IL-6 in individuals with TB, LTBI, and CS .....	<b>57</b>
<b>Figure 2.</b> Specific expression of IL-10 and TGF- $\beta$ by CD8+ T cells in TB, LTBI, and CS .....	<b>58</b>
<b>Figure 3.</b> Ex vivo expression of perforin and granzyme-B from CD8+ T cells in TB, LTBI, and CS individuals.....	<b>60</b>
<b>Figure 4.</b> Representative histogram flow plots of CD8+ T cells expressing IL-10 and TGF- $\beta$ from TB patients stratified according to the bacillary load.....	<b>61</b>
<b>Figure 5.</b> Expression of IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, and granzyme-B from CD8+ T cells of TB patients according to bacillary load.....	<b>62</b>

## Artigo 2

**Table 1.** CTB patient's laboratorial tests.....73

**Figure 1.** Histograms showing flow cytometry results of the percentage of specific TCD8+ cells positive for IFN- $\gamma$  and IL-17 from a TST-healthy control control and the CTB patient.....75

**Figure 2.** Histograms showing flow cytometry results of the percentage of specific TCD8+ cells positive for IL-10, TGF- $\beta$  and IDO from TST-healthy control and CTB patient.....76

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

APC – Alociocianina  
AR – Artrite Reumatoide  
BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente  
BCG – Bacillus Calmete Guérin  
CD – Marcador de Diferenciação  
CFP – Proteína de Filtrado de Cultura  
CR – Receptor do Complemento  
CTACK – Quimiocina de atração de células T cutânea  
DC – Células Dendríticas  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
ELISA – Ensaio imunoenzimático  
ESAT-6 – Antígeno Alvo de Secreção Primária de 6kDa  
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína  
FOXP-3 – Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras (Forkhead Box 3)  
GAPDH – Glutaraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GRO- $\alpha$  – Protein de crescimento alfa  
HGF – Fator de crescimento de hepatócito  
HIV – Human Immunodeficiency Vírus / SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
HspX – Proteína de choque térmico X  
IFN- $\gamma$  - Interferon Gama  
IFN- $\alpha 2$  – Interferon alfa do tipo 2  
IGRA – Ensaio de liberação de IFN  
IL – Interleucina  
IL-2R $\alpha$  – Cadeia alfa do receptor da interleucina 2  
kDa – Quilodalton  
LIF – Fator inibidor de leucócitos  
LPS - Lipopolissacarídeo  
M1 – Macrófagos classicamente ativados  
M2 – Macrófagos alternativamente ativados  
MCP-3 – Protein quimioatraente de macrófago 3  
M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos  
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade  
MIF – Fator inibidor de migração de macrófago  
MIG – Monocina indutora de interferon gama  
MPT51 – Proteína micobacteriana de 27kDa  
MS – Ministério da Saúde  
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*  
NK – Células Natural Killer  
NO – Óxido Nítrico  
NODLR – Nod Like Receptor  
OMS ou WHO – Organização Mundial de Saúde

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico  
PBS – Tampão de Salina Fosfato  
PCR – PCR em tempo real ou quantitativa  
PCR – Reação em cadeia pela polimerase  
PE – Ficoeritrina  
PerCP – Proteína Peridina de Clorofila  
PHA – Fitohemaglutinina  
PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose  
PPD – Derivado Protéico Purificado de cultura de *Mycobacterium tuberculosis*  
PT – Prova Tuberculínica  
RNA – Ácido ribonucleico  
RORc2 – Fator de Transcrição para diferenciação de células Th17 (retinoic-acid related orphan receptor C isoform 2)  
SCF – Fator de células tronco  
SCGF- $\beta$  – Fator de crescimento de células tronco do tipo beta  
SDF-1 $\alpha$  – Fator derivado de células estromais alfa 1  
Sinam – Sistema de agravo de notificações para tuberculose  
T $\gamma\delta$  - Linfócito gamma delta  
TB – Tuberculose  
TBIL – Tuberculose infecção latente  
Tc – Linfócito T citotóxico  
TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento Tumoral Beta  
Th – Linfócito T auxiliar  
TLR – Receptor Semelhante ao Toll  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TNFR – Receptor de TNF  
TNF- $\beta$  – Fator de necrose tumoral beta  
TRAIL – fator de necrose tumoral relacionado ao ligante inductor de apoptose  
Treg – Células T reguladoras  
 $\beta$ -NGF – Fator de crescimento neural beta

## RESUMO

---

A tuberculose (TB) é uma doença causada por *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da TB humana. Milhões de pessoas morrem todo ano em decorrência da TB, doença infecciosa que tem prevenção, tratamento e cura. Um dos maiores problemas enfrentados com essa doença é a infecção latente (TBIL), onde o indivíduo não manifesta os sintomas clínicos e constitui um reservatório da bactéria, podendo desenvolver a doença ativa em qualquer momento. Além disso, a TB pode afetar qualquer órgão do corpo, como por exemplo, a pele, causando uma forma rara de TB extrapulmonar, a TB cutânea. Algumas dessas formas podem ser mais severas que a TB pulmonar, trazendo consequências graves ao paciente, contribuindo para o alto índice de mortalidade dessa enfermidade. Nesse contexto, entender os eventos imunológicos relacionados à interação entre patógeno e o hospedeiro no desenvolvimento da doença ativa ou da infecção latente é um ponto crucial que pode contribuir para o controle da TB. Diante disso, os objetivos desse trabalho foram avaliar a resposta imune específica de células TCD8<sup>+</sup> e citocinas na tuberculose cutânea, latente e pulmonar ativa. Para isso, foram recrutados 36 pacientes com TB pulmonar ativa, 01 paciente com TB cutânea e 36 controles sadios classificados quanto à prova tuberculínica em indivíduos com infecção latente (TBIL = 13) ou não (PT=23). Foram obtidas, de todos os pacientes, as células mononucleares do sangue periférico, o plasma e o soro para realização dos ensaios de citometria de fluxo e ELISA. Foi observado que os pacientes com TB pulmonar ativa apresentam um perfil regulador de células TCD8<sup>+</sup> específicas, com expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  relacionados com a carga bacilar quando comparado aos indivíduos com TBIL e controles sadios PT negativa. Esse mesmo perfil também foi observado e descrito no caso clínico do paciente com TB cutânea. Diante de todos os achados observados nesse trabalho podemos concluir que Mtb pode modular a resposta de células TCD8<sup>+</sup> na tuberculose pulmonar e cutânea, demonstrando a importância de estudos que avaliem a interação imunológica entre o patógeno e o hospedeiro tais como este.

## ABSTRACT

---

Millions of people die every year due to tuberculosis (TB), an infectious disease that have effective treatment, can be prevented and is curable. One of the greatest problems faced by this disease is the latent infection (LTBI), where individuals do not manifest clinical symptoms, is a reservoir of the causing agent, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), and can reactive the disease at any time during their life span. Moreover, TB can affect any organ in the body, such as the skin, causing extrapulmonary TB, a rare form of TB, the TB skin. Some of these forms may be more severe than pulmonary TB, causing serious consequences to the patient, contributing to the high mortality rate of this disease. In this context, understanding the immunological events related to the interaction between pathogen and host the development of active disease or latent infection is a crucial point that can contribute to the control of TB. Thus, the objectives of this study were to evaluate the specific immune response of CD8<sup>+</sup> T cells and cytokines in cutaneous tuberculosis, latent and active pulmonary TB. Thirty six patients with pulmonary TB, one patient with cutaneous TB and 36 healthy controls, classified as LTBI (N = 13) or negative (TST-, N = 23) by the tuberculin skin test were recruited and the peripheral blood mononuclear cells, plasma and sera from those individuals were collected to perform flow cytometry, ELISA and multiplex bead array analysis. It was observed that patients with active pulmonary TB presented TCD8<sup>+</sup> cells with a regulatory profile, expressing IL-10 and TGF- $\beta$  in a direct relation to the bacillary load. The same profile was observed in the individual with cutaneous TB, an extra-pulmonary form of TB. The findings observed in this studyco nclude that Mtb can modulate CD8<sup>+</sup> T cell response in lung and skin tuberculosis, demonstrating the importance of studies assessing the immune interaction between the pathogen and the host.

# 1. INTRODUÇÃO

---

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa grave que afeta milhões de pessoas por ano no mundo todo. A maioria dos indivíduos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bactéria causadora da TB, apresenta infecção assintomática, caracterizada pela forma latente (TBIL), onde o indivíduo não manifesta os sintomas clínicos, porém é portador do bacilo da TB. Neste caso, a pessoa pode desenvolver doença ativa em qualquer época da sua vida, especialmente em condições que geram maior suscetibilidade como a imunossupressão. O diagnóstico dos indivíduos infectados é um dos grandes desafios na saúde pública, uma vez que estes são possíveis fontes de reservatório da bactéria.

Por ser transmitida pelo ar, o principal órgão afetado é o pulmão, onde ocorre a colonização dos alvéolos pulmonares pelas bactérias, que são fagocitadas por células que iniciam a ativação da resposta imune no hospedeiro. Entretanto, a bactéria pode se disseminar para outras regiões do organismo, causando vários tipos de TB extrapulmonar, como é o caso raro da TB cutânea. As interações entre o patógeno e o hospedeiro, independente da forma da TB ainda não foram totalmente desvendadas e os mecanismos pelos quais Mtb consegue burlar o sistema imune e causar a doença ativa ou a infecção latente ainda são alvos de estudos.

A ativação de linfócitos T é um evento crucial que acontece na resposta imune contra Mtb. Sabe-se que as células T auxiliares (Th) possuem fundamental participação no combate a Mtb. Entretanto, outras populações celulares, como a dos linfócitos T citotóxicos (Tc), são importantes nesse processo, porém o seu real envolvimento na imunidade protetora contra Mtb ainda é controverso e foco de muitos estudos. A compreensão dos mecanismos envolvidos entre os linfócitos Tc e Mtb pode ser crucial para desvendar processos na imunopatologia da TB e contribuir para o combate a doença.

Dentro do entendimento da imunopatologia da TB além de desvendar as interações e o papel das diferentes subpopulações celulares envolvidas, compreender como as diferentes citocinas podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de combate ao bacilo e contribuir para auxiliar o diagnóstico da doença ativa.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

A primeira descoberta acerca da tuberculose (TB) data de 1882, quando o cientista alemão Heinrich Hermann Robert Koch isolou o agente causador da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (SHIMAO, 2003; KAUFMANN; WINAU, 2005; SHIMAO, 2005). Devido ao nome de seu descobridor, este também passou a ser conhecido como Bacilo de Koch (MAARTENS; WILKINSON, 2007) e foi o principal marco na história da TB, apesar de ser uma doença que data dos primórdios antigos (CAVE et al., 1991; KONOMI et al., 2002; ZINK et al., 2002; DANIEL, 2006).

Este patógeno conseguiu obter sucesso na instalação da infecção em hospedeiros humanos, possibilitando a persistência da infecção e a consequente manutenção da doença ao longo da evolução humana. As características presentes em seu genoma, que possui um aparato genético contendo cerca de 4000 genes, lhe permitem realizar todas as funções necessárias para sua sobrevivência em situações adversas, com funcionalidades peculiares e permitiram essa co-evolução com o hospedeiro (COLE et al., 1998). Aquelas que mais se destacam são: a patogênese intracelular, a conservação genética, um envelope celular complexo e a capacidade de permanecer em estado de dormência por longos períodos de tempo (WHEELER; RATLEDGE, 1988; COLE et al., 1998).

Apesar da multiplicação lenta (12-24h), tanto em animais infectados quanto em meios de cultura sintéticos, e de serem necessárias condições ideais para o seu crescimento em ambientes artificiais, Mtb possui alta capacidade de adaptação no ambiente *in vivo* (JAMES; WILLIAMS; MARSH, 2000; CRUMP; RELLER, 2003). Embora tenha sido inicialmente classificado como um bacilo aeróbio e intracelular facultativo, evidências recentes têm demonstrado que esta bactéria executa boa parte de suas funções de sobrevivência no hospedeiro em ambientes anaeróbios e extracelulares (ORME, 2014). Mtb é resistente ao processo de descoloração pelo álcool-ácido, sendo classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) podendo sobreviver na ausência quase total de água durante semanas (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Mtb possui uma grande variedade de lipídeos e glicolipídeos envolvendo sua membrana plasmática (CONVERSE et al., 2003). O envelope celular é complexo, pois além do peptidoglicano ancorado, possui uma camada adicional de lipídeos raros, polissacarídeos e proteínas acoplados (COLE et al., 1998; COLLINS; KAUFMANN, 2001; FORRELLAD et al., 2013). Essa estrutura dá a forma característica de bastonetes retos e finos ao bacilo e confere proteção, principalmente da ação mecânica, de enzimas hidrolíticas e radicais tóxicos produzidos pelas células fagocíticas (BRENNAN, 2003; TIWARI et al., 2004). Todos esses componentes contribuem para acionar reações inflamatórias, com ativação e regulação da resposta imune do hospedeiro, contribuindo para a patogênese da TB e consistindo em fatores de virulência cruciais para a sobrevivência de Mtb dentro e fora das células (COLE et al., 1998; FORRELLAD et al., 2013; ORME, 2014).

O sucesso na instalação da infecção e conseqüentemente no desenvolvimento da doença ativa está relacionado com os antígenos produzidos e secretados por Mtb. Além dos componentes de seu envelope celular, proteínas constituem os principais antígenos de Mtb que atuam garantindo a sua sobrevivência e promovem a patogênese da doença. Foi observado que as proteínas são mais expressas quando o Mtb encontra-se em condições de estresse, como por exemplo, na ausência de oxigênio, o que mimetiza a infecção *in vivo* (GELUK et al., 2000). A análise do proteoma de Mtb na infecção *in vivo* identificou mais de 500 proteínas envolvidas em processos biológicos importantes para o estabelecimento da infecção e a sua persistência no hospedeiro (KRUH et al., 2010). Muitas dessas proteínas funcionam como antígenos, que estimulam a resposta imune do hospedeiro e vêm sendo estudados na tentativa de desvendar a interação entre Mtb e os indivíduos infectados e identificar novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas drogas (KRUH et al., 2010; WOLFE et al., 2013; IVANYI, 2014).

Atualmente muitas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando antígenos do Mtb na busca por novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novas vacinas e novos testes diagnósticos (SILVA et al., 2009; DE SOUSA et al., 2013; JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2013; WOLFE et al., 2013; SILVA et al., 2014b). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na avaliação de muitos destes antígenos frente à resposta imune humoral e celular tanto de humanos quanto de camundongos (DE ARAUJO-FILHO et al., 2008; MELO CARDOSO ALMEIDA et al., 2008; REIS et al., 2009; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2014b).

O antígeno MPT51 (Rv3803c) é uma proteína de 27 kDa codificada na região fbpC1 que está envolvida com ligação de Mtb à matriz extracelular do hospedeiro, ligando-se a fibronectina e a pequenos açúcares, promovendo adesão da bactéria na superfície mucosa facilitando assim a entrada nas células hospedeiras (WIKER; HARBOE, 1992; KREMER et al., 2002; WILSON et al., 2004). Apesar de possuir homologia com as proteínas do complexo Ag85, por isso chamada também de Ag85D, não possui atividade micoliltransferase (NAGAI et al., 1991; RAMBUKKANA et al., 1993). As proteínas deste complexo são os principais constituintes secretados na cultura celular de Mtb e são encontrados associados na superfície celular (WIKER; HARBOE, 1992; HORWITZ et al., 1995; WOLFE et al., 2010). Já foi evidenciado que este antígeno pode ser reconhecido por células TCD8+ permitindo assim desvendar seu papel na ativação dessas células (AOSHI et al., 2008). Além disso, este antígeno tem se mostrado um bom marcador para diagnóstico de tuberculose ativa e latente (SINGH, M. et al., 2005; ACHKAR et al., 2006; RABAHI et al., 2007) e um bom componente de vacinas de subunidade proteica (SILVA et al., 2009) e vacinas compostas de proteínas recombinantes (DE SOUSA et al., 2013; JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2013).

O bacilo pode também persistir no hospedeiro no estado de dormência ou latência, condição não replicante caracterizada por baixa atividade metabólica e resistência fenotípica a drogas (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012). As condições responsáveis para a dormência envolvem a ausência de nutrientes essenciais e hipóxia, que conduzem à parada do crescimento de Mtb na fase estacionária (LEISTIKOW et al., 2010; SINGH, S.; SARAAS; SHARMA, 2014), onde são ativados genes que geram uma rápida adaptação à resposta de estresse causada pela imunidade do hospedeiro no local da infecção permitindo sua sobrevivência durante a latência (ORME, 2014; SINGH, S.; SARAAS; SHARMA, 2014). Mtb pode permanecer dormente por longos anos sem manifestação clínica da doença ativa (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012; FORRELLAD et al., 2013), caracterizando assim a tuberculose infecção latente (TBIL). Entretanto, condições de depressão do sistema imune podem promover a reativação da bactéria, onde alguns bacilos voltam a replicar, propagando-se pelo pulmão, causando a TB pulmonar, ou por outros órgãos do corpo, tais como a pele e o intestino, resultando em casos de TB extrapulmonar (SMITH, 2003). Contudo, as bases moleculares para que isso ocorra permanecem obscuras (COLE et al., 1998).

## 2.2 Epidemiologia

A co-evolução de Mtb com a humanidade fez com que a TB se tornasse uma doença infecciosa grave, causando atualmente cerca de 8,6 milhões de novos casos e mais de 1,3 milhões de mortes a cada ano. Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada com Mtb. A doença está espalhada pelo mundo todo e os principais continentes afetados são a Ásia e a África, com destaque para Índia e China que juntas correspondem a 40% dos casos mundiais de TB (WHO, 2013).

A TB no Brasil é um dos seus principais problemas de saúde pública, uma vez que ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 82% do total de casos de tuberculose no mundo. A taxa de incidência de todas as formas de TB gira em torno de 36,1/100.000 habitantes, com 70 mil casos novos notificados em 2012 e uma incidência de casos bacilíferos de 20,7/100.000 habitantes (SVS/MS, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o país representa um dos países da América Latina com maior índice de casos (WHO, 2013).

Segundo o Sistema de Informações sobre Agravos de Notificação (Sinan) em Goiás o coeficiente de mortalidade como causa básica ou associada foi registrado em 2012 foi de 2,1/100.000 habitantes, apresentando também um coeficiente de incidência de todas as formas de TB de 15,0/100.00 habitantes, onde a taxa de casos bacilíferos foi de 8,9/100.000 habitantes e 2,0/100.000 habitantes para os casos de TB extrapulmonar, incluindo a TB cutânea (SVS/MS, 2013). Goiânia e Aparecida de Goiânia são as cidades que concentram a maior parte dos casos já registrados, representando cerca de 90% dos casos em todo o estado de Goiás. A capital é o único município prioritário para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose no estado (SVS/MS, 2013).

Uma das principais preocupações da OMS é o controle da disseminação em populações co-infectadas com outras doenças, que são mais susceptíveis ao desenvolvimento da TB ativa, o que eleva em cerca de 30% o risco de morte. Quando um indivíduo está infectado pelo HIV (*Human Immunodeficiency Vírus*), por exemplo, a chance de desenvolver a TB ativa eleva-se em mais de 12% e a doença apresenta-se disseminada, com rápida progressão podendo ser fatal (SHIMAO, 2003; 2005). Outros fatores de risco incluem a diabetes, a obesidade, o alcoolismo e a má nutrição (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

A vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) que foi desenvolvida em 1921, pelos cientistas Albert Calmette e Camille Guérin e até hoje é a vacina utilizada para prevenir a

tuberculose (CALMETTE, 1931). No Brasil, a BCG é aplicada 6 meses após o nascimento (CALMETTE, 1931; HATHERILL; VERVER; MAHOMED, 2012). Entretanto, essa vacina possui uma eficácia variável (0-80%) e não é totalmente efetiva na proteção contra TB pulmonar, especialmente em indivíduos adultos, uma vez que sua memória imunológica dura cerca de 10 anos (COLDITZ et al., 1994; TRUNZ; FINE; DYE, 2006).

No Brasil, o tratamento para a TB segue as recomendações do Ministério da Saúde. Após observar que a resistência primária à isonizida aumentou (de 4,4 para 6,0%) o esquema de tratamento, que antes era composto por três drogas, passou a ser constituído por quatro drogas: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, sendo este último acrescentado ao novo esquema. Todos os casos novos e recidivas de TB devem ser tratados por 6 meses, sendo que nos dois primeiros meses devem ser administradas as quatro drogas e os quatro últimos somente isoniazida e rifampicina. Essa associação medicamentosa com as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o tratamento adequado evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando, assim, a cura do paciente (MS, 2011).

Dentro deste contexto, o alvo principal para erradicação da TB seria impedir a cadeia de transmissão e controlar a doença, pois embora tenha tratamento e cura, ainda é uma doença preocupante que mata milhões de pessoas no mundo todo (SVS/MS, 2013). Além disso, compreender os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da doença ativa pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de combate da doença.

### **2.3 Imunopatologia da tuberculose**

A infecção por Mtb é mais comumente adquirida através da inalação de gotículas (chamadas de gotículas de Flügge), contendo o bacilo, que são expelidas por uma pessoa com a doença ativa através da fala, tosse ou espirro. Após sofrerem ação do ambiente externo, as gotículas diminuem seu volume, tornando-se núcleos de Wells contendo bacilos que são facilmente inalados (JAMES; WILLIAMS; MARSH, 2000; LAZAREVIC; FLYNN, 2002; DYE et al., 2005). Portanto, o principal meio de transmissão é aéreo. Em decorrência disso, o órgão alvo da doença é o pulmão, embora possa afetar outros sítios anatômicos, uma vez que o bacilo pode se propagar através das

vias linfática e/ou sanguínea causando formas extrapulmonares da doença, como a tuberculose cutânea (RAJA, 2004; DYE et al., 2005).

Ao entrar em contato com o bacilo, 80-90% dos indivíduos desenvolvem uma resposta imune protetora levando à eliminação ou à latência (WAYNE, 1994). Somente 5-10% dos indivíduos infectados apresentam sintomas clínicos e desenvolvem a doença ativa. Outros 5-10% dos indivíduos apresentam a infecção latente (TBIL), onde as manifestações clínicas não são evidentes, poderão sofrer um processo de reativação do Mtb e evoluírem para doença ativa (WAYNE, 1994; BARRY et al., 2009; LIN; FLYNN, 2010). Essas características dificultam o diagnóstico preciso dos indivíduos acometidos, contribuindo para uma maior disseminação da doença (ANDERSEN, 2007). O estabelecimento da doença ativa depende tanto de fatores associados ao bacilo, como a virulência da cepa infectante da micobactéria e a quantidade de bacilos viáveis que atingem o pulmão, quanto fatores associados ao hospedeiro, como a predisposição genética (COLLINS; KAUFMANN, 2001).

Após o contágio, Mtb supera as barreiras protetoras do trato respiratório e aloja-se nos alvéolos pulmonares, onde pode ser reconhecido por macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos e células epitelióides alveolares (BERMUDEZ et al., 2002; BHATT; HICKMAN; SALGAME, 2004; ERNST, 2012). Esse reconhecimento é mediado por receptores de superfície celular (*Toll Like Receptors 2 e 4*, receptor de manose e receptor do complemento tipo 3) e de citosol (*Nod Like Receptors*) que podem ou não promover ativação celular (QUESNIAUX et al., 2004), resultando na fagocitose do bacilo, expressão de citocinas e quimiocinas e ainda promovendo recrutamento celular (ADEREM; UNDERHILL, 1999; DOHERTY; ARDITI, 2004; ANDERSEN, 2007; ERNST, 2012; OTTENHOFF, 2012).

A fagocitose por macrófagos alveolares é o primeiro evento na relação do patógeno com o hospedeiro estando diretamente envolvida na evolução da doença (ULRICHS et al., 2004; ULRICHS; KAUFMANN, 2006; ORME, 2014), uma vez que constitui um dos primeiros mecanismos de tentativa de eliminação do patógeno. A polarização de macrófagos M1 (classicamente ativados) induzida por IFN- $\gamma$  ou LPS, é caracterizada pelo aumento da produção de óxido nítrico, IL-1, IL-12 e fagocitose (MILLS et al., 2000; STOUT; SUTTLES, 2005) contribuindo para a resposta imune efetiva contra Mtb. Já os macrófagos M2 (alternativamente ativados) são induzidos na presença de IL-4 e IL-13, resultando no aumento da expressão de arginase 1, receptor de manose e secreção de citocinas anti-inflamatórias e poliaminas, contribuindo para a

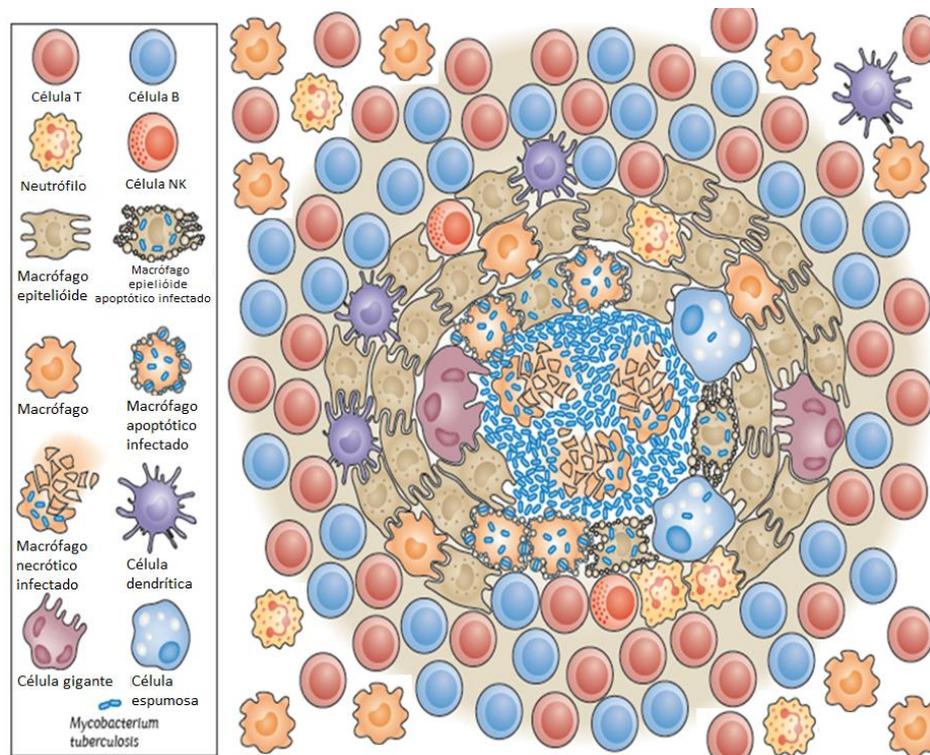
reparação tecidual (GOERDT et al., 1999; MILLS et al., 2000; STOUT; SUTTLES, 2005; ANDRADE et al., 2012). A ação destes últimos ajuda a minimizar o dano tecidual provocado por Mtb (REDENTE et al., 2010).

É uma etapa crucial, pois os receptores envolvidos na captura dos bacilos são essenciais para a ativação da imunidade adaptativa. Dentro de 2 a 6 semanas após a infecção, ocorre o desenvolvimento da imunidade mediada por células resultando em um influxo de linfócitos e monócitos ativados para o local da lesão resultando na formação do granuloma (RAJA, 2004). Entretanto, Mtb é capaz de atrasar a resposta imune adaptativa inibindo a migração de células infectadas para os linfonodos drenantes e permitindo que seja gerada uma grande quantidade de bactérias antes que a resposta adaptativa possa se desenvolver para controlar a infecção (ERNST, 2012; OTTENHOFF, 2012).

Em resposta a infecção por Mtb, as células infectadas produzem citocinas e quimiocinas que vão recrutar novas células para o local da infecção (DANNENBERG, 1991; SAUNDERS; COOPER, 2000; OTTENHOFF, 2012). Além disso, o próprio Mtb pode induzir a migração de células para o sítio da infecção, através da produção de antígenos, como por exemplo, o ESAT-6 (antígeno alvo de secreção primária de 6kDa), que ao ser reconhecido através do TLR2 pelas células epiteliais, induz a produção de metaloproteinase 9 que é um potente quimioatrante celular e também causa a destruição da matriz extracelular promovendo o recrutamento de macrófagos não infectados (BANAIEE et al., 2006). Além disso, essa estrutura tem papel fundamental na doença, uma vez que sua formação é parte crucial da estratégia de virulência e patogenia da tuberculose (LAWN; ZUMLA, 2011).

Durante o desenvolvimento do granuloma, os macrófagos evoluem para células epitelióides especializadas ou podem se fundir formando células gigantes multinucleadas ou ainda se diferenciarem em macrófagos espumosos (caracterizados pelo acúmulo intracelular de lipídeos) que junto com os linfócitos e polimorfonucleares, circundam os macrófagos infectados formando a região central do granuloma. Na periferia são observados linfócitos T e B que modulam a resposta dos macrófagos. Muitos outros tipos celulares podem povoar o granuloma, como células NK (*Natural Killer*) e células dendríticas (RAMAKRISHNAN, 2012) (Figura 1). Há também a proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos que irão nutrir as regiões mais externas dessa estrutura granulomatosa. Com o passar do tempo e de acordo com o crescimento do granuloma, pode ocorrer necrose caseosa da região central em decorrência da carência nutricional

(DANNENBERG, 1991; SAUNDERS; COOPER, 2000; ULRICH; KAUFMANN, 2006; RAMAKRISHNAN, 2012) ou da presença do Mtb (ULRICH; KAUFMANN, 2006).



**Figura 1.** Esquema representativo da estrutura e dos constituintes celulares do granuloma formado em uma infecção por Mtb. Vale ressaltar que o granuloma não é uma estrutura estática, onde as células se aglomeram e permanecem imóveis. É uma estrutura altamente dinâmica que promove a proliferação da bactéria. Adaptado de Ramakrishnan 2012.

O granuloma é uma tentativa do sistema imune de segregar a infecção, prevenindo a disseminação da bactéria e focando a resposta imune diretamente no sítio de implantação. Sua estruturação depende de um complexo sistema que envolve a produção e interação de quimiocinas e citocinas por células efetoras do sistema imune e células teciduais (ERNST, 2012), sendo que o recrutamento celular e a conexão da estrutura dependem de citocinas pró-inflamatórias e imunoregulatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e a interleucina 1 (IL-1) (ERNST, 2012; OTTENHOFF, 2012; RAMAKRISHNAN, 2012).

A principal citocina envolvida na formação do granuloma é o TNF- $\alpha$ , liberado pelos macrófagos logo após a exposição a antígenos de Mtb. O TNF- $\alpha$  recruta neutrófilos e monócitos circulantes ao mesmo tempo em que outras citocinas, como o IFN- $\gamma$  produzido pelas células T e pelas células NK potencializa as atividades microbicidas,

ativando macrófagos e células dendríticas (FLYNN; CHAN, 2001; ERNST, 2012). As células epitelióides e as células gigantes possuem a capacidade de ativar os fibroblastos a produzir colágeno e elastina, resultando em um aspecto mais consistente e rígido do granuloma (WANGOO et al., 2005).

Apesar das evidências de que o granuloma é formado na tentativa de restringir a infecção, pesquisas recentes têm demonstrado um novo papel desta estrutura na infecção por Mtb: a multiplicação do bacilo. A indução de apoptose nos macrófagos infectados faz com que outros macrófagos, ainda não infectados fagocitem a membranas apoptóticas na tentativa de conter a infecção. Porém, Mtb induz necrose nas células infectadas, gerando um microambiente propício a sua sobrevivência, uma vez que os bacilos possuem a capacidade de sobreviver no meio extracelular obtendo energia através dos lipídeos que são liberados com a morte celular até infectar novas células que estão migrando para o local da infecção. Esses mecanismos contribuem para a progressão e propagação da infecção (DANNENBERG, 1991; PARK, J. S. et al., 2006; LESLEY; RAMAKRISHNAN, 2008; ORME, 2014).

Além disso, o granuloma não é uma estrutura estática, onde as células se aglomeram e permanecem imóveis. É uma estrutura altamente dinâmica, gerada em um microambiente inflamatório, onde as células do hospedeiro estão em constante interação umas com as outras e com Mtb (LESLEY; RAMAKRISHNAN, 2008; OTTENHOFF, 2012; RAMAKRISHNAN, 2012). Neste contexto, durante a formação do granuloma, observamos que enquanto a resposta imune do hospedeiro tenta induzir proteção, Mtb promove mecanismos capazes de expandir a infecção utilizando-se desta resposta podendo gerar a TBIL ou o desenvolvimento da doença ativa (DAVIS; RAMAKRISHNAN, 2009; OTTENHOFF, 2012).

Apesar dos fagócitos serem as primeiras células que entrarão em contato com Mtb no pulmão iniciando a resposta imune, não há evidências de sua atuação no sucesso da resposta imune que consegue conter o bacilo e manter a infecção latente. Esta resposta é comprovadamente uma resposta imune celular mediada por linfócitos (OTTENHOFF, 2012). Entretanto, a ação de algumas células, é fundamental para direcionar a resposta imune, como é o caso dos macrófagos que exibem diversas propriedades bioquímicas que influenciam na imunopatologia da TB (REDENTE et al., 2010; ERNST, 2012; OTTENHOFF, 2012).

Durante o desenvolvimento da infecção, Mtb reside principalmente dentro dos macrófagos, células que exercem uma potente atividade antimicrobiana intercedida por

hidrolases ácidas, mediadores da oxidação (ex. intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio) e peptídeos catiônicos (ex. catelecidina) que podem promover a morte da micobactéria (NICHOLSON et al., 1996; RAJA, 2004). Evidências experimentais mostram a importância da explosão oxidativa na defesa de macrófagos na TB humana (FLESCHE; KAUFMANN, 1987; FLYNN; CHAN, 2001; PODINOVSKAIA et al., 2013). Adicionalmente, conforme descrito anteriormente, as citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos ativados recrutam outras células para o sítio de infecção promovendo uma hábil resposta contra Mtb. Porém, além destes, células dendríticas, neutrófilos e células NK compartilham desses processos (FLYNN; CHAN, 2001).

As células dendríticas capturam os bacilos no interior dos pulmões e migram para os linfonodos drenantes mais próximos onde ocorre a apresentação de antígenos micobacterianos a células T virgens (SAUNDERS; COOPER, 2000; WOODWORTH et al., 2011), iniciando a ativação da resposta imune adaptativa com efetiva participação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> auxiliares (Th), TCD8<sup>+</sup> citotóxicos (Tc) e dos linfócitos B (MAZZACCARO et al., 1998; COOPER, 2009; TORRADO; COOPER, 2011). Além disso, as células T não convencionais (T CD1 restritas e T $\gamma\delta$ ) e os linfócitos B possuem especificidade para antígenos não proteicos e podem ser ativadas por outros mecanismos (BARNES et al., 1992; STENGER; NIAZI; MODLIN, 1998). A partir daí, as células efetoras diferenciadas específicas para antígenos de Mtb migram através do sangue seguindo um gradiente de concentração de quimioatraentes e receptores de membrana até o sítio de infecção para combater o agente invasor (OTTENHOFF, 2012).

A ativação das células frente ao Mtb assim como o dano tecidual gerado no local da resposta culmina com a produção de uma série de moléculas que caem na corrente circulatória promovendo diferentes mecanismos de ação na imunopatologia da TB. Dentre essas moléculas encontram-se fatores de crescimento, produzidos principalmente por células endoteliais, que promovem a sobrevivência e diferenciação celular. Além destes, citocinas e quimiocinas são produzidas abundantemente promovendo a ativação, diferenciação, inibição celular ou até mesmo aumento da expressão de moléculas de adesão, resultando em um influxo cada vez maior de células para o local da infecção (FLYNN; CHAN, 2001; ERNST, 2012; OTTENHOFF, 2012).

O microambiente inflamatório gerado em resposta aos antígenos de Mtb associado aos sinais gerados pelas células da imunidade inata pode induzir a diferenciação em subpopulações de células T distintas com funções específicas. Essa polarização será determinada por eventos de sinalização intracelulares, que ativarão

fatores transcricionais, assim como por mecanismos epigenéticos (WEI et al., 2009; ARENS; SCHOENBERGER, 2010). A diferenciação dessas células possui certa plasticidade que permite que uma célula já diferenciada em determinada subpopulação celular, mude o seu aparato de ativação intracelular e se diferencie em outra subpopulação, por ação de outras citocinas presentes no local da ativação. A ação das diferentes subpopulações celulares na resposta imune pode contribuir diretamente para a patogênese da doença e ainda determinar a sua evolução.

Sabe-se que as células T auxiliares (Th) apresentam diferenciação em subpopulações com as mais distintas funções nas respostas imunes frente a diferentes patógenos (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). Assim como as células Th, as células Tc também apresentam plasticidade e se diferenciam em subpopulações produtoras de citocinas com funções específicas (ARENS; SCHOENBERGER, 2010). Na imunopatologia da TB, as subpopulações de células Th têm sido bem descritas e caracterizadas (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; SILVA et al., 2014b). Entretanto, muito ainda deve ser estudado acerca da indução de diferentes subpopulações de células Tc na TB, especialmente em humanos.

O fato de que os antígenos de Mtb são apresentados preferencialmente pela via de MHC de classe II, na qual somente células Th reconhecem, fez com que as células Tc fossem deixadas de lado durante muito tempo. Entretanto a necessidade de matar eficientemente células infectadas com Mtb associada à descoberta da apresentação cruzada e da capacidade que alguns antígenos apresentam de evadir do fagolisossomo para o citosol da célula fez com que as células Tc passassem a receber maior atenção (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008).

Os linfócitos Tc contribuem de maneira significativa na resposta imune ao Mtb, através do reconhecimento de antígenos pela via de MHC de classe I que culmina com sua ativação e consequente destruição de células infectadas. Os mecanismos de destruição das células infectadas por linfócitos Tc baseiam-se na liberação de grânulos contendo moléculas citotóxicas que possuem a capacidade de formar poros na membrana das células hospedeiras (perforinas) e provocarem a morte das células infectadas (granzimas e granulinas) (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008; BEHAR, 2013). Já foi comprovado que a indução da morte do Mtb é dependente deste mecanismo (STENGER et al., 1997).

Além disso, estas células possuem a capacidade de induzir apoptose através da expressão da molécula de superfície CD95L (FasL) que se liga ao CD95 (Fas) das células

infectadas, induzindo apoptose (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008). Outro mecanismo adicional de indução de morte celular pelos linfócitos Tc é a expressão do TNFR, que possui função análoga ao TNF- $\alpha$  (BEHAR, 2013). Porém tem sido descrito que estes mecanismos não são suficientes para destruição do Mtb (STENGER et al., 1997; RAJA, 2004). Concomitantemente a estes processos, as células citotóxicas produzem citocinas, que promovem a ativação de outras populações celulares, contribuindo para o combate ao Mtb (COLLINS; KAUFMANN, 2001; FLYNN; CHAN, 2001; HARARI et al., 2011a; ROZOT et al., 2013). Porém o real papel das células Tc na imunidade contra TB permanece controverso e na TB humana, tem sido pobremente estudado.

As primeiras células TCD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas descritas na TB foram as células Tc1 (TCD8+IFN- $\gamma$ +) com funções semelhantes às células Th1 na imunologia da tuberculose que são mediadas pelo IFN- $\gamma$  (COLLINS; KAUFMANN, 2001; RAJA, 2004). Estudos têm mostrado que pacientes com tuberculose ativa apresentam maior porcentagem de células Tc1 no sangue periférico e no lavado bronqueoalveolar (BARCELOS et al., 2006; WU, Y. E. et al., 2009), confirmando a indução e a importância dessa subpopulação na resposta imune a Mtb. Além disso, na ausência de células TCD4<sup>+</sup>, as células TCD8<sup>+</sup> aumentam a sua produção de IFN- $\gamma$  e sua função citotóxica para responder a infecção micobacteriana (STENGER et al., 1997). A importância da imunidade protetora de células TCD8<sup>+</sup> é evidenciada em estudos com pacientes portadores do vírus HIV que apresentam robusta resposta imune destas células para evitar o desenvolvimento da doença ativa em indivíduos que apresentam a infecção latente (SHAO et al., 2008).

Posteriormente, constatou-se que estas células teriam a capacidade de produzir outras citocinas além do IFN- $\gamma$ , como o TNF- $\alpha$  e a IL-2, caracterizando as células polifuncionais TCD8<sup>+</sup> (DAY et al., 2011). Além destas, novas subpopulações de células TCD8<sup>+</sup> vêm sendo descritas. A subpopulação de células Tc17 (TCD8+IL-17+) foi recentemente descrita em indivíduos sadios (KONDO et al., 2009) e na tuberculose pleural (LI et al., 2013). Porém, esta subpopulação celular ainda não foi estudada em indivíduos com tuberculose extrapulmonar, pulmonar ativa ou com TBIL. Em modelo murino, esta subpopulação já foi descrita em uveíte autoimune, câncer e esclerose múltipla, apresentando forte participação na patogênese da doença avaliada e também um potencial inflamatório, com a capacidade adicional de matar células infectadas através da

produção de moléculas citotóxicas (PENG et al., 2007; NAM et al., 2008; TZARTOS et al., 2008).

As células TCD8+ foram primariamente descritas como tendo habilidade imunossupressora (GERSHON et al., 1971), entretanto, a função reguladora de células TCD4+ ganhou maior destaque, uma vez que esta encontra-se mais abundante. Apesar disso, muitos estudos têm descrito e estabelecido funções reguladoras às células TCD8+ mediadas pelas suas citocinas produzidas (GILLIET; LIU, 2002; SARANTOPOULOS; LU; CANTOR, 2004; XYSTRAKIS et al., 2004). Evidências sugerem a participação dessas células na regulação da resposta imune a TB através da produção de citocinas como a IL-10, que é uma citocina reguladora que atua inibindo a ativação de outras células (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; DE ARAUJO-FILHO et al., 2008). Além destas, novas subpopulações de células Tc vem sendo descobertas (LIU, Y. et al., 2014). Evidenciar subpopulações de células TCD8+ com potencial regulador na imunologia da tuberculose pode ajudar a elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na imunopatologia da doença uma vez que a resposta imune reguladora pode interferir no mecanismo de proteção instalado para combater a infecção.

Uma vez que nos deparamos com as mais variadas formas extrapulmonares de TB, a resposta imune é diferente de acordo com o local da infecção. Entretanto, em alguns casos, como a TB miliar, a avaliação passa a ser sistêmica, pois a predição do local de infecção fica comprometida.

Apesar de todo o aparato imunológico montado para combater o bacilo, este interfere nos mecanismos de defesa do hospedeiro através de inúmeros mecanismos de evasão e isto pode ser crucial para a sobrevivência de Mtb nas células (DAFFE; ETIENNE, 1999). Mtb utiliza diferentes estratégias para escapar da resposta imunológica no indivíduo infectado, seja através de ações que dificultam a apresentação de antígenos, do bloqueio de funções vitais das células até a inibição de vias de sinalização intracelulares e da indução de morte celular (SIBLEY et al., 1988; CHATTERJEE et al., 1991; HMAMA et al., 1998; MOHAGHEGHPUR et al., 1998; DAFFE; ETIENNE, 1999; COLLINS; KAUFMANN, 2001; LIMA et al., 2001; ULRICH; KAUFMANN, 2006). Todos os meios de evasão que Mtb possui garantem maior disseminação do bacilo e confluem em mecanismos-chaves que permitem instalar a infecção, culminando com o desenvolvimento da doença ativa (OTTENHOFF, 2012).

## 2.4 Tuberculose infecção latente

A tuberculose infecção latente (TBIL) é definida pela presença de uma resposta imune específica ao Mtb na ausência de manifestações clínicas da doença. Entretanto não se sabe se esta resposta existe devido à presença do bacilo viável no organismo ou se a resposta se manteve após a erradicação de Mtb (BARRY et al., 2009; YOUNG; GIDEON; WILKINSON, 2009). Existem vários estudos que comprovam a persistência do bacilo caracterizando a TBIL. Pesquisadores já confirmaram a presença de DNA micobacteriano em múmias do Egito antigo (CAVE et al., 1991; KONOMI et al., 2002; ZINK et al., 2002), em fósseis na África que datam de 15.000 anos (DANIEL, 2006) e em células endoteliais, fibroblastos e pneumócitos do tipo II de tecido pulmonar de indivíduos sadios de área endêmica para a TB (HERNANDEZ-PANDO et al., 2000). Gedde-Dahl (1952) demonstrou que indivíduos infectados, caracterizados como prova tuberculínica positiva e que apresentavam alterações radiográficas de lesões pulmonares semelhantes à TB, desenvolveram a doença ativa durante um período de acompanhamento de 7 anos (GEDDE-DAHL, 1952). A partir daí, estudos em modelos animais e em indivíduos (*pós-mortem*) que não apresentavam sinais nem sintomas sugestivos de TB auxiliaram na demonstração da persistência do bacilo sem manifestação da doença ativa (OPIE, 1927; ROBERTSON, 1933; FELDMAN; BAGGENSTOSS, 1938).

Durante a TBIL o sistema imune do hospedeiro é capaz de conter os bacilos num estado persistente de não replicação onde a evolução da infecção depende dos resultados da interação entre o hospedeiro e o bacilo. Ao penetrarem no tecido pulmonar, os bacilos conseguem sobreviver nos macrófagos alveolares através de vários mecanismos de escape permanecendo em um estado de dormência (HERNANDEZ-PANDO; OROZCO; AGUILAR, 2009). As interações decorrentes do reconhecimento do Mtb pelas células do sistema imune resultam na formação do granuloma. E a persistência dos bacilos viáveis no interior dos granulomas é a principal característica da TBIL. Estima-se que 2 bilhões de pessoas no mundo todo são portadoras latentes de Mtb e destas cerca de 2 – 5% poderão sofrer reativação e culminar no desenvolvimento da doença ativa (DYE et al., 1999).

A presença ou não de atividade metabólica do bacilo durante a TBIL sempre foi questionada. O estado quiescente em que o bacilo se encontra leva a crer que seu metabolismo estaria suprimido, devido às condições no microambiente. O pH baixo, o

estresse gerado pela explosão oxidativa, a escassez de nutrientes, a depleção de oxigênio e a limitação de ferro seriam fatores que levariam o Mtb a permanecer em um estado quiescente (WAYNE, 1994; BETTS et al., 2002; OHNO et al., 2003; PARK, H. D. et al., 2003). Portanto, acreditava-se que a TBIL correspondia a um estado no qual a infecção por Mtb foi contida, sem a erradicação total do bacilo, que daria a habilidade de sair do estado de dormência e promover o desenvolvimento de TB ativa quando o sistema imune do hospedeiro sofresse algum tipo de supressão (ULRICHS; KAUFMANN, 2006).

Entretanto, após o sequenciamento completo do genoma do Mtb (H37Rv), observou-se que este apresenta sistemas complexos capazes de realizar operações metabólicas mesmo durante o estado de latência (COLE et al., 1998). Pesquisas realizadas com a análise da expressão de RNA de Mtb em escarro de pacientes com TB ativa e em pulmões de camundongos infectados cronicamente com Mtb revelaram que ocorrem mudanças na expressão gênica do bacilo para sua adaptação aos ambientes hostis, com um aumento da expressão dos genes da região Dos-R (programa genético de regulação de Mtb), dos genes envolvidos nas vias de utilização de lipídeos como fonte de energia e regulação negativa dos genes envolvidos no metabolismo aeróbio e na proliferação quando Mtb estava em estado não replicativo (TALAAT et al., 2007; GARTON et al., 2008). A partir de todos estes estudos, observa-se que o bacilo e o sistema imune do hospedeiro estão em dinâmica interação durante a infecção latente nos indivíduos imunocompetentes (CARDONA, 2009).

A constatação da TBIL se dá pela resposta imune ao bacilo por meio do teste da prova tuberculínica (PT), também conhecido como reação de Mantoux, que avalia a presença de linfócitos T de memória através da reação de hipersensibilidade tardia a um conjunto de antígenos purificados da cultura do complexo Mtb, conhecido como PPD (derivado proteico purificado) (MENZIES, 1999). Novos testes têm sido pesquisados na tentativa de evidenciar a TBIL tanto em indivíduos imunocompetentes quanto naqueles imunodeprimidos (TANNUS SILVA et al., 2012; COSTANTINO et al., 2013).

Por conseguinte, na TBIL não há doença aparente, a bactéria não está se replicando e tem baixa atividade metabólica, traducional e transcricional. Há um equilíbrio entre o hospedeiro e o bacilo, sendo que, em resposta à infecção o indivíduo desenvolverá uma resposta imune que essencialmente impede a doença de evoluir para sua forma ativa e a bactéria continuamente se evade da eliminação, logo, esse equilíbrio é capaz de prevenir a ativação da doença, na maioria dos indivíduos latentes, por toda a vida (FLYNN; CHAN, 2001; LIN; FLYNN, 2010).

As interações entre as células do hospedeiro e os antígenos de Mtb na TBIL têm sido estudadas na tentativa de evidenciar quais mecanismos imunes estariam envolvidos com o processo de transição da infecção latente para a doença ativa. Tem sido descrito que há um aumento na frequência de células Th1 específicas e T reguladoras em indivíduos com TBIL (HERZMANN et al., 2012) e uma resposta reduzida de células Th17 está associada com a evolução clínica na infecção por Mtb (CHEN et al., 2010). Além disso, existe um equilíbrio entre o crescimento bacteriano e a patologia gerada pelos processos inflamatórios, resultando na latência (LIN; FLYNN, 2010; GIDEON; FLYNN, 2011).

## **2.5 Diagnóstico da tuberculose**

O diagnóstico da TB ativa baseia-se em exames clínicos, radiológicos e laboratoriais, onde a identificação do bacilo em espécimes do trato respiratório (TB pulmonar) ou de outros sítios de infecção (TB extrapulmonar) confirma o diagnóstico laboratorial. O exame clínico é o primeiro a ser realizado, onde o indivíduo é avaliado de acordo com os possíveis sinais e sintomas da doença que consistem em febre, sudorese noturna, emagrecimento, mal-estar e tosse com ou sem escarro durante 2-3 semanas. Posteriormente a pessoa pode apresentar expectoração sanguínea purulenta e caquexia. Após suspeita, o primeiro teste a ser realizado é o raio-X do tórax seguido da baciloscopia e posteriormente de outros testes confirmatórios ou acessórios no diagnóstico, tais como a cultura e a prova tuberculínica (CONDE et al., 2009; GONZALEZ-MARTIN et al., 2010).

A radiografia do tórax avalia as mudanças estruturais que correspondem à patogênese da TB que ocorreram no pulmão após o desenvolvimento da doença ativa. Os principais achados são infiltrados parenquimatosos ou opacidades, linfadenopatia, atelectasia segmentar, condensação broncopneumônica, cavitação, granuloma com calcificação, fibrose, derrame pleural e TB miliar, que juntos ou isolados procedem a um resultado sugestivo de TB. Em alguns casos, o resultado da radiografia de tórax pode ser atípico, sendo necessário realizar outra técnica para sugerir a TB. Embora não seja um resultado específico, a radiografia reflete fielmente as alterações ocorridas em resposta à imunidade celular e por isso é utilizado no diagnóstico da TB pulmonar, embora seja necessário outro teste confirmatório (LEUNG, 1999; MADUSKAR et al., 2013).

A prova tuberculínica (PT) é o teste padrão utilizado no diagnóstico da infecção por *Mtb* em indivíduos sadios (WHO, 2013). Consiste na aplicação intradérmica do derivado proteico purificado (PPD) e na avaliação da imunidade mediada por células na forma de hipersensibilidade tardia gerada em resposta aos antígenos presentes no PPD (MENZIES, 1999). Esta técnica também é amplamente utilizada na triagem de TBIL em populações susceptíveis ao desenvolvimento da TB ativa (RABAHI et al., 2007; REIS et al., 2011; SILVA et al., 2014b). Entretanto, esta técnica possui algumas limitações, uma vez que o PPD é constituído por antígenos comuns do *Mtb*, do *M. bovis* BCG e de micobactérias ambientais, gerando baixa especificidade em países onde há a vacinação com o BCG e a exposição à micobactérias ambientais e baixa sensibilidade em indivíduos imunocomprometidos (PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008; RUIZ-MANZANO et al., 2008). Apesar de todas as intercorrências que envolvem a PT, ela ainda é amplamente utilizada especialmente aqui no Brasil (MS, 2011).

A baciloscopia é uma técnica rápida, fácil e acessível no diagnóstico da TB, entretanto apresenta uma sensibilidade muito variável (30-80%) podendo comprometer o diagnóstico de indivíduos infectados com baixa carga bacilar que frequentemente apresentam resultado negativo (STEINGART et al., 2006). Consiste na pesquisa do bacilo no escarro por meio da coloração de Ziehl-Neelsen onde os bacilos são contados em vários campos da lâmina e os valores são expressos de acordo com carga bacilar do paciente (DE KANTOR, 2011). Outro tipo de coloração que pode ser usada é a com auramina-rodamina fluorescente, que apresenta menor tempo de leitura e acurácia semelhante a da coloração de Ziehl-Neelsen. Entretanto seu custo é mais elevado e necessita de profissionais capacitados para sua realização (CONDE et al., 2009). O resultado também é expresso de acordo com a carga bacilar (GONZALEZ-MARTIN et al., 2010). A baciloscopia também é utilizada para monitorar a eficácia do tratamento, uma vez que a carga bacilar reduz com o tratamento efetivo (CONDE et al., 2009; PARIDA, 2012; KIK et al., 2014). Vale ressaltar que a carga bacilar pode influenciar a resposta imune induzida pelo indivíduo (DAY et al., 2011; JURADO et al., 2012).

A cultura da micobactéria deve ser realizada em todos os indivíduos com suspeita de TB, uma vez que é considerado o teste padrão ouro no diagnóstico dessa doença. Apresenta grande sensibilidade e sua realização ainda possibilita a identificação da espécie causadora da doença e a avaliação da sensibilidade a antibióticos. O principal inconveniente do teste de cultura é a sua lentidão na obtenção dos resultados, determinados pelas características metabólicas do patógeno (DORMAN, 2010). Pode ser

realizada tanto em meios sólidos quanto em meios líquidos, entretanto é recomendada sempre a realização do teste nos dois tipos de meio de cultura, pois os meios líquidos podem apresentar resultados falso-negativos (LEUNG, 1999; RISHI et al., 2007).

Para tentar superar os problemas encontrados com a utilização da PT na identificação de TBIL, diferentes testes têm sido desenvolvidos. Dentre eles, testes que se baseiam na imunidade celular chamados de IGRAs (*interferon gamma release assays*) têm sido amplamente pesquisados. Tais testes baseiam-se na detecção do IFN- $\gamma$  por células T estimuladas com os antígenos ESAT-6 e CFP-10. Estão disponíveis comercialmente para fins de pesquisa dois IGRAs: o T-SPOT.TB (Oxford Immunotech, Abingdon, UK) e o QuantiFERON-TB Gold In-tube, (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia) que se baseiam nas técnicas de ELISPOT e ELISA para detecção do IFN- $\gamma$ , respectivamente (PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008; COSTANTINO et al., 2013). Os IGRAs têm mostrado resultados contraditórios em países com alta prevalência da doença, como o Brasil, onde o custo destes testes ainda é alto, pois apresentam sensibilidade reduzida, com desempenho semelhante à PT (DHEDA et al., 2009; MARQUES et al., 2009).

Um teste rápido desenvolvido recentemente, o GeneXpert MTB/RIF, foi inserido na prática diagnóstica dos centros de saúde ano passado em 92 cidades do país (SVS/MS, 2014). Este teste baseia-se na técnica da reação em cadeia pela polimerase que detecta simultaneamente Mtb e resistência a rifampicina no escarro dos pacientes suspeitos (ZEKA; TASBAKAN; CAVUSOGLU, 2011). Além de fornecer vantagem no tempo e na precisão do diagnóstico, o GeneXpert MTB/RIF determinará o medicamento a ser prescrito ao paciente, reduzindo os casos de morte por bactérias multidroga-resistentes. O resultado do teste é obtido em duas horas e possui uma sensibilidade estimada de 99%. Entretanto, a sensibilidade pode estar reduzida em indivíduos com baixa carga bacilar e é um teste que exige profissionais treinados para sua realização (BODMER; STROHLE, 2012).

O diagnóstico da TB ativa baseado nos testes da radiografia de tórax e na baciloscopia ou no GenXpert, podem garantir um eficiente diagnóstico da doença, com indicação imediata do tratamento correto. Já o diagnóstico da TBIL permanece complexo e cheio de complicações, especialmente na triagem de indivíduos com doenças autoimunes que iniciarão terapia imunossupressora. Portanto, o desenvolvimento de novos testes diagnósticos para TBIL ainda é foco de muitos estudos.

### **3. JUSTIFICATIVA**

---

A TB possui prevenção, diagnóstico, tratamento e o mais importante cura, mas ainda é uma doença que consegue se perpetuar e matar milhões de pessoas no mundo todo, principalmente capacidade que Mtb possui de evadir do sistema imune e causando a infecção latente. Só no Brasil possui um coeficiente de mortalidade de 3,8/100.000 habitantes com estimativa de cerca de 50 milhões de pessoas infectadas pelo bacilo da TB (SVS/MS, 2013). Todos esses fatores fazem desta doença uma prioridade da OMS na tentativa de controlar sua disseminação.

Apesar do vasto conhecimento da imunopatologia desta infecção muito ainda precisa ser elucidado, especialmente no que se refere às células TCD8+, pois são células essenciais na resposta imune contra Mtb, uma vez que promovem a morte de células infectadas e ainda produzem citocinas que contribuem para a ativação de outras células. Portanto, torna-se crucial os estudos básicos que completem as lacunas do conhecimento da resposta imune induzida frente a este patógeno nas mais variadas formas de TB (extrapulmonar, pulmonar ativa e latente). A análise da interação das células TCD8+ com Mtb pode esclarecer mecanismos imunológicos da doença facilitando o entendimento da sua patogenia e permitindo compreender o processo de instalação da infecção, uma vez que estas células estão envolvidas na eliminação eficaz dos bacilos através da morte de células infectadas, contribuindo assim para esclarecer mecanismos de interação entre o patógeno e o hospedeiro e permitir o desenvolvimento de novos alvos biológicos para combater o bacilo.

Dentro deste contexto, a avaliação e caracterização de fatores imunes relacionados com a interação entre Mtb e hospedeiro torna-se crucial, especialmente no entendimento do desenvolvimento da doença ativa ou na sua latência. A análise de citocinas e suas diferentes ações no microambiente inflamatório assim como sistemicamente, pode revelar possíveis analogias que contribuirão para discernir o que pode ser benéfico ou maléfico para o indivíduo infectado durante o tratamento e colaborar para avanços tecnológicos no combate ao controle de disseminação da doença.

## **4. OBJETIVOS**

---

### **4.1 Objetivo Geral:**

Caracterizar a resposta imune específica de células TCD8+ e citocinas na tuberculose cutânea, pulmonar ativa e latente.

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar a resposta imune de subpopulações funcionais de células TCD8+ específicas ao antígeno recombinante MPT51 de Mtb em pacientes com TB, indivíduos com TBIL e controles sadios por citometria de fluxo;
- Avaliar a resposta imune de subpopulações funcionais de células TCD8+ específicas ao antígeno recombinante MPT51 de Mtb em um paciente com TB cutânea por citometria de fluxo;

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **5.1 População de estudo**

Os estudos aqui apresentados foram realizados em 73 indivíduos que incluíram 36 pacientes com tuberculose pulmonar ativa (média de idade= 41,8±14,7 anos), um paciente com tuberculose cutânea (50 anos) e 36 controles sadios pareados por sexo e idade aos pacientes com TB recrutados durante o período de 2009 a 2012 nos municípios de Goiânia e Aparecida de Goiânia, em Goiás. Tais estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás de acordo com o processo HC/UFG n. 055/2009 (ANEXO 1). Os pacientes foram recrutados no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, no Hospital das Clínicas de Goiânia e no CAIS Jardim Nova Era, independente da etnia ou do sexo. O período de tratamento de todos os pacientes recrutados foi de seis meses a partir do diagnóstico, no qual todos os pacientes negativaram o exame da baciloscopia.

Os critérios de inclusão utilizados para os pacientes com TB foram: diagnóstico de tuberculose confirmado por baciloscopia e radiografia de tórax positiva ou cultura positiva para *M. tuberculosis* e tratamento iniciado em até 15 dias. Os indivíduos sadios foram recrutados aleatoriamente no bairro do paciente fonte ou no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG e classificados quanto à resposta à prova tuberculínica (PT), conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013). Critérios de exclusão adotados para todos os grupos foram: indivíduos menores de 18 anos, grávidas e portadores de imunodeficiências ou infectados pelo HIV.

### **5.2 Realização da prova tuberculínica**

Depois de preenchido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2) foi aplicado um questionário para coleta de dados sócio-epidemiológicos

(ANEXO 3) de todos os indivíduos incluídos no estudo. Em seguida, todos os controles sadios foram submetidos à prova tuberculínica (PT) para permitir a classificação em indivíduos PT negativa ou PT positiva (TBIL). O teste consistiu na aplicação intradérmica de 100 µL de PPD RT-23551 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) no antebraço esquerdo de cada participante (técnica de Mantoux). A leitura da endureção cutânea foi realizada 72 horas após a aplicação e os resultados foram expressos em milímetros. Controles sadios que apresentaram endureção cutânea com diâmetro  $\geq 10$  mm (n=13) foram classificados como PT positivos (TBIL), conforme preconizado pela OMS (WHO, 2013).

### **5.3 Coleta das amostras**

Amostras de sangue periférico foram obtidas por punção intravenosa a vácuo através da coleta de 20 mL de sangue em tubos *Vacutainer* contendo ou não heparina (Becton & Dickinson) de todos os indivíduos incluídos no estudo. Todo o material utilizado era descartável e o procedimento de coleta de sangue seguiu as normas de biossegurança padronizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Foram obtidos o plasma (sangue contendo heparina) e o soro (tubo seco) após centrifugação das amostras de sangue a 2000 rpm por 5 minutos a 6°C. Ambos foram alicotados em tubos *eppendorfs* contendo 200µL cada e armazenados a -80°C para posterior realização dos ensaios de quantificação de IL-6. Todo o procedimento de separação das amostras, desde a coleta ao armazenamento, foi realizado no gelo.

### **5.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico**

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade com *Ficoll-Paque Plus* (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). O sangue total coletado com heparina foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,9% estéril) na proporção de 1:1 e em seguida pipetado cuidadosamente em 3 vezes o volume em solução de *Ficoll-Paque Plus* (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) em um tubo de poliestireno tipo Falcon 50mL (TPP, Switzerland) sendo, posteriormente centrifugado a 1000 xg por 20 minutos a 23°C formando assim uma interface entre os líquidos (anel branco). O anel de células mononucleares foi coletado usando pipeta Pasteur e transferido para um novo tubo de

poliestireno tipo Falcon 15 mL (TPP, Switzerland). Para lavagem do mesmo, foi adicionado 12mL de PBS 0,9% estéril e decorrido o período de centrifugação de 10 minutos a 1000 xg a 4°C o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI completo (RPMI MédiuM 1640 GIBCO™ + 0,15% de Bicabornato de sódio, 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina 200mM SIGMA®, 1% de Penicilina-estreptomocina SIGMA®, 1% de Piruvato de sódio SIGMA®, 1% de Aminoácidos não essenciais 100X SIGMA®). A quantificação das células foi determinada após contagem em câmara de *neubauer* utilizando o corante *tuerk* e alicotadas em 2 tubos contendo a mesma concentração celular. Uma alíquota foi ressuspenso em 2mL de meio RPMI completo para realização dos ensaios de cultura celular e a outra alíquota foi ressuspenso em SBF 10% e DMSO para armazenamento a -80°C.

### 5.5 Antígeno Protéico

Foi utilizado o antígeno proteico recombinante MPT51 (rMPT51) produzido no Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, desenvolvido a partir da proteína de *Mtb*. A purificação da mesma foi realizada em condições desnaturantes utilizando o kit (Qiagen, Germany). Para isto, uma cultura de *E. coli* expressando rMPT51 foi crescida em meio LB. O sedimento celular foi ressuspenso em 8mL de tampão de lise desnaturante (6 M guanidine HCl, 20 mM sodium phosphate, pH 7.8, 500 mM NaCl). Após a lise foi transferido para coluna Ni-NTA e após processo de lavagem, a proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição (8 M urea, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 4.0). O produto da purificação foi avaliado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A concentração de proteína obtida foi determinada em NanoDrop 2000 Thermo Scientific.

### 5.6 Cultura e estimulação das células

PBMC foram cultivadas na presença do antígeno recombinante MPT51 (2µg/ml) para posterior ensaio de citometria de fluxo. As células foram adicionadas em placas de cultura celular de poliestireno de 96 poços (Cell Wells™) em um volume de 200µl (2x10<sup>5</sup> células por poço). A concentração celular foi ajustada após a contagem em câmara

de *neubauer* utilizando o corante *líquido de tuerck*. As células foram também cultivadas na ausência de estímulo (MEIO) e ou estimuladas com PHA (Phytohemagglutinin GibcoBRL Cat. Nº 10576-015 Life Technologies™) na concentração de 2µg/ml, como controle positivo. As células foram cultivadas e estimuladas durante 4 (*ex vivo*) ou 90 horas (*in vitro*) em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C na presença de anti-CD3 (1µg/ml) (eBioscience – clone OKT3).

### 5.7 Citometria de fluxo de células TCD8+

Após 90 horas de cultura, as células foram tratadas com monensina (Golgi Stop BD™) e incubadas por 4-6 horas a em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C. Em seguida as células foram centrifugadas a 2000 xg por 10 minutos a 23°C. Após retirado o sobrenadante, cuidadosamente, foram acrescentados 200µL de PBS azida sódica em cada poço das placas de cultura celular e estas foram incubadas por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e foram adicionados 5µL de cada anticorpo monoclonal de superfície celular, seguindo a marcação de cada painel conforme quadro 1. Foram utilizados controles de isotipos em cada experimento (IgG). Após incubação por 30 minutos a 4°C na ausência de luz, as suspensões celulares foram tratadas com PBS paraformaldeído 0,4%, azida sódica 0,1% por 15 minutos a 4°C na ausência de luz. Depois de centrifugadas a 5000 xg por 10 minutos, 100µL de Saponina (Perma/Wash™ Buffer 10x stock, BD, Bioscience) foram adicionados a cada poço da placa de cultura celular e as células foram incubadas por 15 minutos a 4°C na ausência de luz. Após centrifugação a 5000 xg por 10 minutos a 4°C, foram adicionados 5µl de cada anticorpo monoclonal para marcação intracelular, seguindo os painéis conforme quadro 1. Todos os anticorpos utilizados eram da eBioscience ou da BD Pharmingen. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C na ausência de luz e em seguida foi acrescentado *perm wash* 1X, centrifugando em 5000 xg por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em PBS, azida sódica 0.1%. As aquisições foram realizadas em citometro de fluxo (BD FACS Canto II, San Jose, Califórnia) na FARMATEC/UFG.

O tratamento das células avaliadas no ensaio *ex vivo* seguiu o mesmo protocolo, sem o tratamento com monensina, entretanto para marcação foram utilizados os anticorpos de acordo com o painéis descritos no quadro 2. Para obtenção do número absoluto de células TCD8+ no sangue periférico dos indivíduos estudados, a

porcentagem de cada uma dessas subpopulações foi multiplicada pelo total de leucócitos de cada indivíduo obtido por meio do hemograma.

**Quadro 1.** Anticorpos utilizados na citometria de fluxo para marcação celular após cultura de 96h.

Anticorpos	Painel	FITC	PE	PerCP	APC
<b>Superfície e Intracelular</b>	1	IFN- $\gamma$ (4S.B3)	IL-17 (64DEC17)		CD8 (12780)
	2	FoxP3 (PCH101)	TGF- $\beta$ (TB21)	CD25 (BC96)	CD8 (12780)
	3	IFN- $\gamma$ (4S.B3)	IL-10 (JES3-9D7)		CD8 (12780)
	4*	IDO (H10I1010)	Granzima B (GB11)		CD8 (12780)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína, PE: Ficoeritrina, PerCP: Proteína Peridinina de Clorofila, APC: Aloficocianina. O clone de cada anticorpo utilizado está indicado entre parênteses. \* painel utilizado apenas no estudo da TB cutânea.

**Quadro 2.** Anticorpos utilizados na citometria de fluxo para marcação celular *ex vivo*.

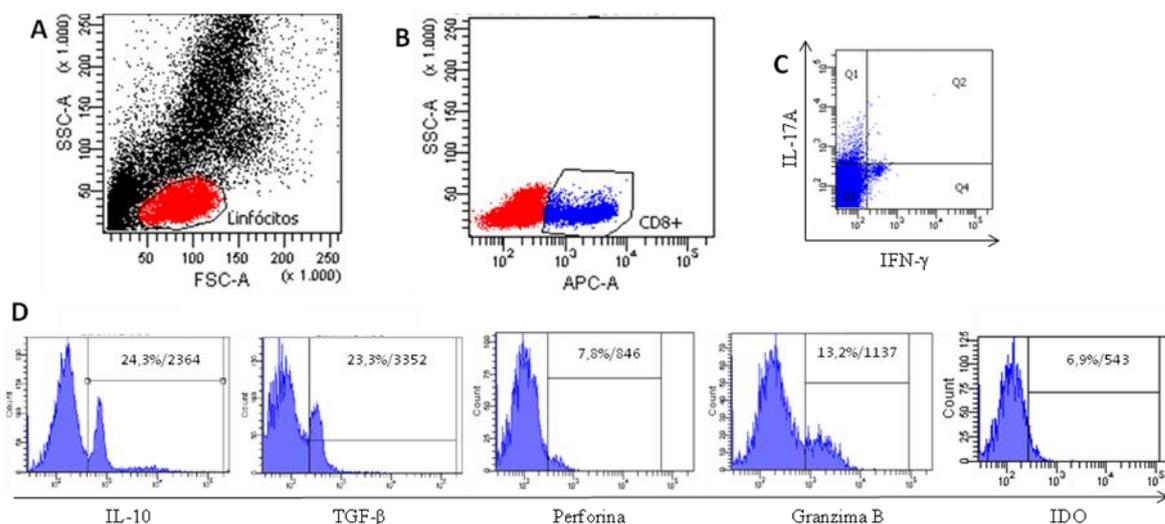
Anticorpos	Painel	FITC	PE	PerCP	APC
<b>Superfície e Intracelular</b>	1	Perforina (dG9)	Granzima B (GB11)		CD8 (12780)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína, PE: Ficoeritrina, PerCP: Proteína Peridinina de Clorofila, APC: Aloficocianina. O clone de cada anticorpo utilizado está indicado entre parênteses.

### 5.8 Análise das células TCD8+

Para analisar as diferentes subpopulações funcionais de células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>), utilizamos os parâmetros celulares que caracterizam cada população em foco. Inicialmente as células dos indivíduos incluídos no estudo foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC), onde foi

selecionada a população de linfócitos (Figura 2A). Em seguida, foi realizada a seleção da população de células CD8<sup>+</sup> de acordo com a fluorescência do anticorpo monoclonal APC, utilizando o parâmetro da granulosidade (Figura 2B). A partir destes linfócitos foram selecionadas as subpopulações funcionais celulares de interesse de acordo com cada marcador específico, seguindo-se os painéis conforme descrito nos quadros 1 e 2. As análises da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-17 foram feitas de acordo com a porcentagem de células específicas para o antígeno MPT51 (Figura 2C). Já a expressão de IL-10, TGF- $\beta$ , Perforina, Granzima B e IDO foram analisadas além da porcentagem, quanto à média de intensidade de fluorescência de expressão de cada marcador (Figura 2D). A porcentagem das células TCD8<sup>+</sup> foi avaliada e comparada entre os grupos como forma de controle interno do experimento.



**Figura 2.** Exemplos de *Dot Plots* de citometria de fluxo representando a análise das subpopulações funcionais de linfócitos TCD8<sup>+</sup> em um paciente com tuberculose pulmonar ativa. A – Seleção de linfócitos do sangue periférico de um dos pacientes com tuberculose após estímulo com rMPT51 de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). B – Seleção da população de células TCD8<sup>+</sup> de acordo com a fluorescência. C – Parâmetros utilizados para quantificação da porcentagem de células TCD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>. D – Parâmetros utilizados para quantificação da porcentagem de células IL-10<sup>+</sup>, TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, Perforina<sup>+</sup>, Granzima<sup>+</sup> B e IDO<sup>+</sup> e da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de cada marcador nas células TCD8<sup>+</sup>. As análises foram realizadas no software BD FACS DIVA. Os dados apresentados nas figuras são %/MIF, respectivamente.

## 5.9 ELISA para detecção de IL-6

Os níveis séricos de IL-6 foram quantificados utilizando o kit BD OptEIA™ (BD Pharmingen) de acordo com as instruções do fabricante. Foram pipetados 50 µL de diluente em cada poço da placa. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de reagente padrão e amostras em seus respectivos poços. As placas foram agitadas a 10 xg por 5 segundos, cobertas com papel adesivo e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com 300 µL por poço de tampão de lavagem, por 5 vezes. Após a última lavagem, foi colocado papel absorvente para remover o excesso de tampão. Em seguida, foram adicionados 100 µL de conjugado e as placas foram cobertas com selante de placa e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas por 7 vezes. Após a última lavagem foi adicionado 100µL de reagente substrato Tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente e longe do alcance da luz. Posteriormente, foi adicionado 50µL de solução de parada H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em cada poço. A reação foi lida em absorbância de 450 nm. O limite de detecção do kit era de 4,7 pg/mL. Todo o procedimento foi realizado no gelo. Em cada ensaio foi feita sua referida curva padrão, nos quais todos os padrões e amostras foram processados em duplicata.

## 5.10 Análise Estatística

Para análise dos resultados da citometria de fluxo foi utilizado o programa Software BD FACSDiva Versão 6 (BD Bioscience). A tabulação dos resultados e construção dos gráficos foram feitas através dos programas GraphPad Prism Versão 5 e Microsoft Office Excel. A mediana e o desvio padrão, bem como a amplitude de variação dentro de cada grupo foram calculados para avaliar os resultados. Depois de analisar a normalidade dos dados através de gráficos quantitativos, foi utilizado o teste de ANOVA (Kruskal Wallis) para comparar as variações entre os grupos. Como a variação da magnitude de cada grupo não foi diferente, um F-teste e um valor de p foram calculados para prever as diferenças entre os resultados médios de cada grupo. Um teste pos hoc (test t de Student ou Mann Whitney-Wilcoxon) foi utilizado para avaliar se cada par de grupos específicos eram diferentes uns dos outros. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (p<0,05).

## **6. RESULTADOS**

---

### **Artigo 1 – Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis**

Autores: Bruna Daniella de Souza Silva, Monalisa Martins Trentini, Adeliane Castro da Costa, André Kipnis, Ana Paula Junqueira-Kipnis

Publicado no periódico Immunology Letters

### **Artigo 2 – Late diagnosis and TCD8 immune response profile of cutaneous tuberculosis: A case report**

Autores: Bruna Daniella de Souza Silva, Sueli Lemes de Ávila Alves, André Kipnis, Ana Paula Junqueira-Kipnis

Publicado no periódico Open Journal of Immunology

## 6.1 Artigo 1

### Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis

Silva, B.D.S.; Trentini, M.M.; Costa, A.C.; Kipnis, A.; Junqueira-Kipnis, A.P.\*

Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology. Tropical Pathology and Public Health Institute. Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

\*Corresponding author: Ana Paula Junqueira-Kipnis, Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Rua 235 esquina com Primeira Avenida, S/N, Setor Universitário, Goiânia, Goiás. Brasil. CEP: 74605-050. Tel.: 55 6232096174, E-mail: apkipnis@gmail.com

Immunology Letters 160 (2014) 23–32



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/immlet](http://www.elsevier.com/locate/immlet)



### Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis



Bruna Daniella de Souza Silva, Monalisa Martins Trentini, Adeliane Castro da Costa, Andre Kipnis, Ana Paula Junqueira-Kipnis\*

Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 30 January 2014

Received in revised form 20 March 2014

Accepted 21 March 2014

Available online 30 March 2014

##### Keywords:

CD8+ T cells

Bacilloscopy

Human tuberculosis

#### ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that affects millions of people worldwide with an annual mortality rate of 1.3 million. The mechanisms contributing to the loss of balance of immune responses and progression to active tuberculosis disease are unknown. Although CD4+ and CD8+ T cells and the cytokines they produce are crucial for protection against tuberculosis they have different roles in tuberculosis immunology. The function of CD4+ T cells has been extensively studied; however, less is known about the phenotype and function of CD8+ T cells. This study evaluated the specific expression of IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, and TGF- $\beta$  and *ex vivo* expression of perforin and granzyme-B by CD8+ T cells from active tuberculosis individuals compared with latent infected individuals and non-latent infected individuals. Tuberculosis responses were correlated with the bacilloscopy score. We observed that the presence of IL-10 and TGF- $\beta$  expression and down-expression of granzyme-B in CD8+ T cells correlated with increased sputum bacillary load in active tuberculosis individuals. These findings provide new insights into the role of CD8+ T cells in *Mycobacterium tuberculosis* disease.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## **Abstract**

Tuberculosis is an infectious disease that affects millions of people worldwide with an annual mortality rate of 1.3 million. The mechanisms contributing to the loss of balance of immune responses and progression to active tuberculosis disease are unknown. Although CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and the cytokines they produce are crucial for protection against tuberculosis they have different roles in tuberculosis immunology. The function of CD4<sup>+</sup> T cells has been extensively studied, however less is known about the phenotype and function of CD8<sup>+</sup> T cells. This study evaluated the specific expression of IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, and TGF- $\beta$  and *ex vivo* expression of perforin and granzyme-B by CD8<sup>+</sup> T cells from active tuberculosis individuals compared with latent infected individuals and non-latent infected individuals. Tuberculosis responses were correlated with the bacilloscopy score. We observed that the presence of IL-10 and TGF- $\beta$  expression and down-expression of granzyme-B in CD8<sup>+</sup> T cells correlated with increased sputum bacillary load in active tuberculosis individuals. These findings provide new insights into the role of CD8<sup>+</sup> T cells in *Mycobacterium tuberculosis* disease.

Keywords: CD8<sup>+</sup> T cells, bacilloscopy, human tuberculosis

## Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that affects millions of people worldwide with a mortality rate of 1.3 million people. The dissemination of multi-drug resistant Mtb and the continuing HIV/AIDS outbreak has led to the perpetuation of a global epidemic of TB. According to the World Health Organization, one third of the world's population is latently infected with Mtb (LTBI), of which 5–10% develop active TB (WHO, 2012). However, the exact mechanisms contributing to the loss of balance of immune responses and the progression to active TB disease are unknown.

T-cell immunity is crucial for Mtb infection control and both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells play important roles in host protection. Although IFN- $\gamma$  has a vital function against Mtb infection (FLYNN; CHAN, 2001; JURADO et al., 2012; KASSA et al., 2012), a complex network of other cytokines, such as IL-17 (TORRADO; COOPER, 2010; JURADO et al., 2012; KASSA et al., 2012; LI et al., 2013), IL-6 (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; BORGSTROM et al., 2012; KASSA et al., 2012), IL-10 (BOUSSIOTIS et al., 2000; KASSA et al., 2012; KUMAR et al., 2013) and TGF- $\beta$  (ROBERTS et al., 2007) may play a role in the immunopathogenesis of Mtb infection. Additionally, Harari et al. (2011) and Rozot et al. (2013) demonstrated that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations were functionally different in patients with active TB and subjects with LTBI, respectively, suggesting a different role of these cells in the immunology of TB (HARARI et al., 2011b; ROZOT et al., 2013).

While most studies have focused on the characterization of CD4<sup>+</sup> T cells in TB, less is known about the phenotype and function of CD8<sup>+</sup> T cells and their mechanisms of action, which remain highly controversial. Different roles of Mtb-specific CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to human Mtb infection have been proposed (BEHAR, 2013; POLLOCK et al., 2013; ROZOT et al., 2013). The main function ascribed to CD8<sup>+</sup> T cells is cytolytic activity to kill infected cells mediated by cytotoxic granules such as perforin, granzyme B and granulysin, with residual Fas-L and TNFR-dependent cytolytic activity (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008). In addition, CD8<sup>+</sup> T-cell-produced cytokines have also been the subject of much research (LI et al., 2013; POLLOCK et al., 2013; ROZOT et al., 2013). IL-17-secreting CD8 (Tc17) effector cells have been described in healthy subjects (KONDO et al., 2009) and in tuberculous pleural effusion (LI et al.,

2013) and have been associated with the pathogenesis of many diseases in mice (PENG et al., 2007; NAM et al., 2008; TZARTOS et al., 2008). However, their role in pulmonary tuberculosis is unknown. Recently, many studies have described and established CD8+ T cells with regulatory functions (DE ARAUJO-FILHO et al., 2008; PINHEIRO et al., 2012; ROZOT et al., 2013), but their involvement in the pathogenesis of TB has not been clarified. Highlighting novel functions of CD8+ T cells in the immunology of TB may help elucidate the mechanisms involved in disease pathogenesis.

Active pulmonary TB is the most common clinical manifestation of TB and is characterized by high levels of bacterial replication and the presence of acid-fast bacilli (AFB) in sputum. Although there is no direct quantitative measurement of bacillary load, previous clinical studies indicated that sputum smear grading at the time of diagnosis (negative, scanty, 1+, 2+, or 3+) is predictive of relapse and recurrence of TB disease (GOPI et al., 2006; HESSELING et al., 2010). Moreover, sputum smear grading correlates with disease severity by chest radiograph scoring (RALPH et al., 2010). Recently, studies correlated cytokine production from lymphocytes and disease severity. TB severity was associated with increased levels of CD4+IFN- $\gamma$ +IL-17+ and CD8+ T cells and reduced levels of polyfunctional or IL-2-producing Mtb-specific CD4+ T cells (DAY et al., 2011; JURADO et al., 2012). The aim of this study was to evaluate CD8+ T-cell-specific cytokine and perforin/granzyme expression in active TB and correlate its response with the bacilloscopy score.

## **Materials and Methods**

### *Ethics*

All studies were approved by the Hospital of the Federal University of Goiás Ethics Committee (protocol number: 055/2009), and informed consent and a clinical questionnaire were obtained from all participating subjects.

### *Study populations*

This was a transversal descriptive study composed of three groups: TB, composed of active pulmonary patients; LTBI, composed of latent Mtb infected individuals, and TST-, composed of non-latent infected individuals. TB patients were consecutively

recruited at the Hospital de Doenças Tropicais and Hospital das Clínicas in Goiânia, and Centro de Atenção Integral a Saúde do Jardim Nova Era (CAIS Jd. Nova Era) in Aparecida de Goiânia, Goiás, Brazil and 36 patients who presented with inclusion criteria agreed to participate in this study. TB patients were recruited independent of sex and race and inclusion criteria for TB patients were pulmonary TB diagnosis based on epidemiologic history, signs, and symptoms, and chest x-ray findings consistent with TB. All included patients had positive sputum smear microscopy within 15 days of TB treatment. The number of AFB in sputum smears was counted according to the World Health Organization guidelines (DE KANTOR et al., 1998), and three groups of TB patients were enrolled: 1+ (10–99 AFB per 100 fields); 2+ (1–10 AFB per field in 50 fields), or 3+ (more than 10 AFB per field in 20 fields). During the same period, healthy individuals with no TB and without symptoms of other investigative diseases were recruited at the Universidade Federal de Goiás. Healthy individuals were recruited, matched by sex and age to TB patients, and classified according to the tuberculin skin test (TST). Exclusion criteria for all individuals were pregnancy, positive serology for HIV, and aged younger than 18 years.

#### *Tuberculin skin test*

Healthy individuals (n=36) were administered the TST to characterize latent Mtb infection. All individuals received 0.1 mL of purified protein derivative (PPD-RT 23 Mtb-2 UT, Copenhagen, Denmark) intradermally (Mantoux technique) in the left forearm. The size of skin induration was measured along the longer transverse axis 72 h later and the result was expressed in millimeters. Individuals with TST  $\leq$  9 mm were classified as TST– and were included in the TST- group (n=23). Individuals with TST > 10 mm were classified as TST+ and were included in the LTBI group (n=13) according to the World Health Organization classification (WHO, 2010).

#### *Peripheral blood mononuclear cells and culture*

Sixteen milliliters of peripheral blood was collected in heparinized tubes from each individual and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient density centrifugation using Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB). The cells were washed twice in saline and a total of  $2 \times 10^5$  cells/well were

cultured in 96-well culture plates for 96 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and recombinant Mtb antigen (rMPT51, 2 µg/mL) in the presence of anti-CD3 (eBioscience) and RPMI 1640 supplemented medium as previously reported (SILVA et al., 2014b). PBMC cultured in the medium or phytohemagglutinin (PHA, 2 µg/mL) were used for negative and positive controls, respectively.

#### *IL-6 detection*

Levels of IL-6 in the plasma were measured using standard Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go! Kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Concentrations of IL-6 in the samples were calculated with a standard curve generated from recombinant IL-6, and results were expressed as pg/mL. The sensitivity of the assay was 2 pg/mL.

#### *Flow cytometry*

Cell surface and intracellular staining was performed using the following monoclonal antibodies: IFN- $\gamma$ -FITC, CD8-APC, granzyme-B-PE (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), IL-10-PE, IL-17-PE (eBioscience), TGF- $\beta$ -PE (IQ Products), and IgG1-FITC and IgG1-PE (BD Pharmingen) as an isotype control according to the manufacturer's instructions. Cells were labeled with CD8-APC and with rat IgG1-PE isotype control to set up a gate for the IL-17, granzyme-B, IL-10, and TGF- $\beta$  positive cells. Cells were also labeled with CD8-APC and rat IgG1-FITC isotype control to set up a gate for IFN- $\gamma$  and Perforin-positive cells. Briefly, cells cultured with medium alone, PHA, or TB antigen were treated with Golgi Stop Solution (containing monensin, BD Pharmingen) and after 4–6 h of further incubation, they were harvested for analysis. The cells were treated with PBS containing 0.05% azide for 20 min prior to surface and intracellular staining. After centrifugation 800 x g 10 min, cells were stained at 4°C for 18 min with CD8-APC. Subsequently, the plates were washed twice with PBS containing 0.05% azide and treated with PermFix (BD Pharmingen) for 18 min. For intracellular staining, cells were permeabilized with Perm Wash buffer (BD Pharmingen) and incubated at 4°C for 18 min with the following specific antibodies: IFN- $\gamma$ -FITC, Perforin-FITC, granzyme-B-PE (BD Pharmingen), IL-10-PE, IL-17-PE (eBioscience),

and TGF- $\beta$ -PE (IQ Products). After washing, the samples were immediately analyzed on a FATST-Canto II apparatus (Becton Dickinson) at the FARMATEC/UFG (Goiás, Brazil). At least 50,000 events were acquired per sample. Data analysis was performed using FATST-Diva software (BD Becton Dickinson).

### *Statistical analysis*

The mean and standard error of the mean (SEM) were calculated. After assessing normality of all data by quantile plots, one-way analysis of variance was used to compare variances between the groups. As the variance magnitude from each group was similar, an F-test and  $p$ -values were calculated to predict the differences between the mean results of each group. A post-hoc test (Kruskal–Wallis test) was used to evaluate whether each specific group pair was different from each other. A  $p$  value less than  $< 0.05$  was considered statistically significant. To calculate the relationship between IL-10 and TGF- $\beta$  T CD8 expression, the mean fluorescence for each cytokines for an individual were plotted in a xy graph and a linear regression was determined.

## **Results**

### *Characteristics of study participants*

A total of 72 individuals (36 patients with TB and 36 healthy individuals in LTBI (n=13) and TST- (n=23) groups) were included in the study. Recently diagnosed pulmonary TB patients with a mean age of 41.8 years were mainly male (61.1%), the majority of whom were BCG vaccinated. Only 36.1% of TB patients had previous contact with active TB. The majority of TB patients (n=16) presented with a high bacillary load and 27.7% (n=10) presented with a cavity by X-ray but did not present with multi-drug-resistant TB. Concomitant predominant diseases in these patients were hypertension and diabetes mellitus. Fifty percent of TB patients were smokers (Table 1). Among LTBI individuals (n=13) the mean age was 38.9 years and 69.2% had previous contact with TB. The majority was BCG vaccinated and three individuals presented with hypertension. The control subject group (non-infected individuals) had a mean age of 35.4 years and all were vaccinated with BCG before 6 months of age. Around 30% of TST- individuals had previous contact with TB. A large percentage of the healthy

individuals were smokers (LTBI=38.4% and TST-=26.1%). The characteristics of TB patients and healthy individuals are shown in Table 1.

**Table 1.** Characteristics of study participants

<i>Characteristics</i>	<i>TST-</i> ( <i>n=23</i> )	<i>LTBI</i> <i>TST+</i> ( <i>n=13</i> )	<i>Tuberculosis</i> ( <i>n=36</i> )
Male/female, n (%)	16/7 (69.5/30.4)	6/7 (46.2/53.8)	22/14 (61.1/38.9)
Mean age (minimum–maximum)	35.4 (22–69)	38.9 (22–72)	41.8 (20–71)
BCG, n (%)	23 (100)	11 (84.6)	27 (75)
History of contact with TB, n (%)	7 (30.4)	9 (69.2)	13 (36.1)
Current smokers, n (%)	6 (26.1)	5 (38.4)	18 (50)
Concomitant diseases, n (%)			
Hypertension	1 (4.3)	3 (23.7)	5 (16.6)
Diabetes mellitus	0 (0)	0 (0)	3 (8.3)
Anemia	0 (0)	0 (0)	2 (5.5)
Gout	0 (0)	0 (0)	2 (5.5)
Pneumonia	2 (8.6)	0 (0)	2 (5.5)
Cardiovascular	0 (0)	1 (7.6)	2 (5.5)
Gastrointestinal	3 (13)	0 (0)	1 (2.7)
Autoimmune	0 (0)	0 (0)	2 (5.5)
Other diseases	4 (17.3)	1 (7.6)	3 (8.3)
Presence of cavity	ng	ng	10 (27.7)
Smear grade of bacillary load, n (%)			
1+	ng	ng	14 (38.9)
2+	ng	ng	6 (16.6)
3+	ng	ng	16 (44.5)
*Percentage of CD8+ T Cells (mim-max)	30.9±6.9 (18.5-40.5)	30.4±3.9 (24.3-37.4)	37.2±4.2 (31-44.8)
*Total number of CD8+ T cells x10 <sup>5</sup> (mim-max)	1.6±0.4 (1.0-2.3)	2.2±0.3 (1.8-2.6)	4.0±0.7 (3.1-5.3)

TB: tuberculosis; TST: Tuberculin Skin Test; BCG: Bacillus Calmette Guérin; ng: negative. TB patients were divided according to bacillary load: 1+ (10–99 acid-fast bacilli (AFB) per 100 fields); 2+ (1–10 AFB per field in 50 fields), or 3+ (> 10 AFB per field in 20 fields). \* PBMC CD8 T cells.

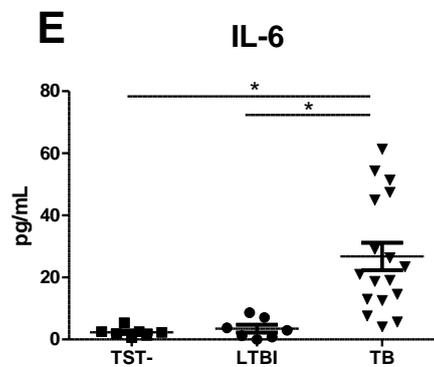
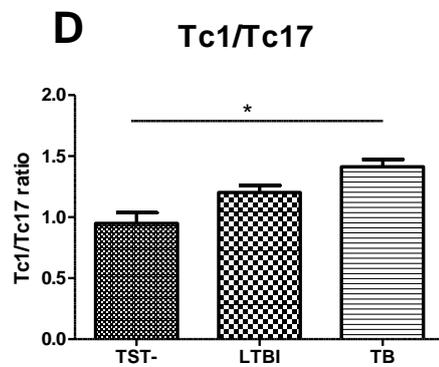
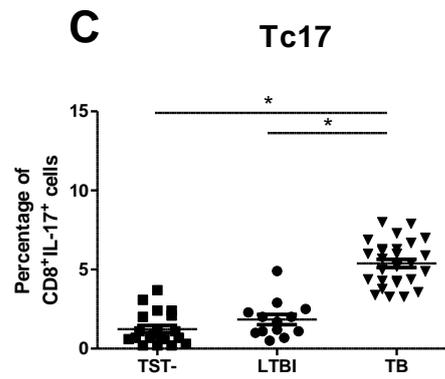
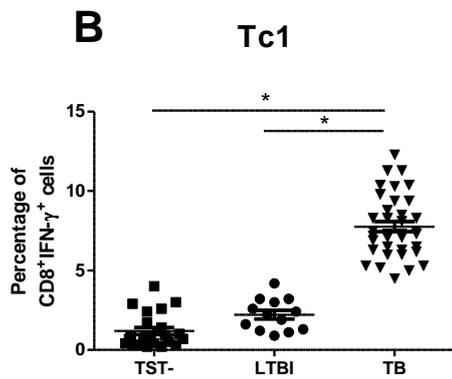
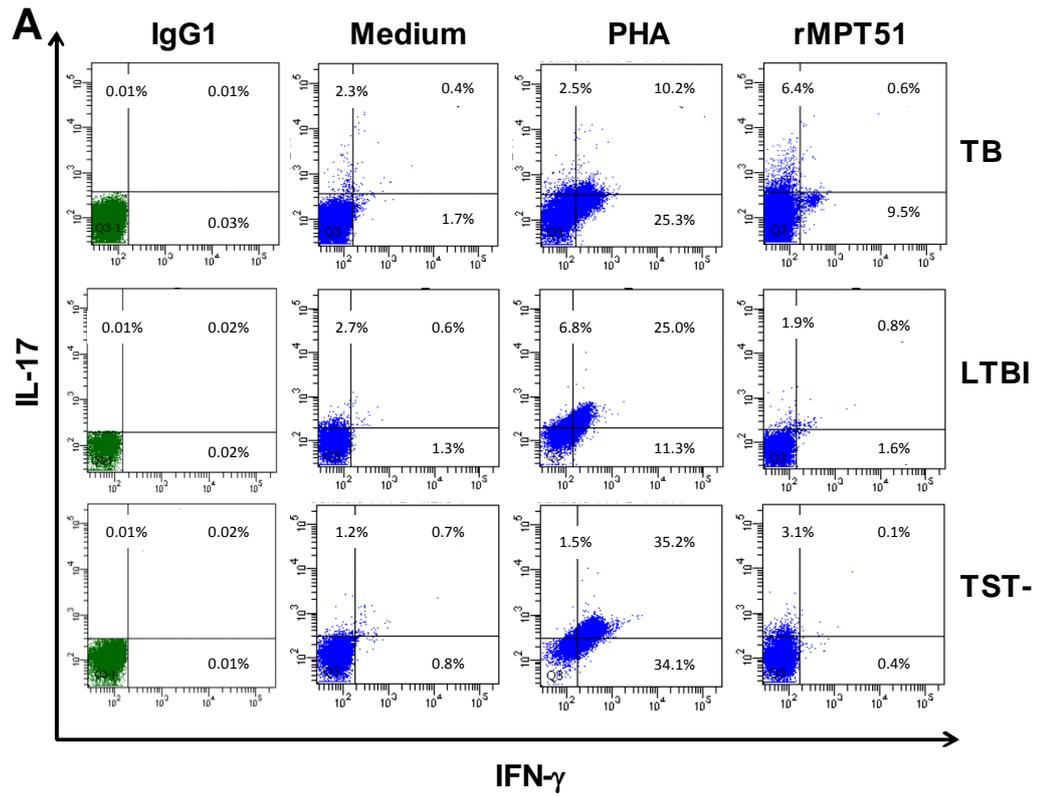
### *Specific Tc1 and Tc17 cells and IL-6 in active tuberculosis*

PBMCs from TB, LTBI, and TST- were analyzed for IFN- $\gamma$  (Tc1) and IL-17 (Tc17) expression after rMPT51 stimulus (Fig. 1A). Specific Tc1 (Fig. 1B) and Tc17 (Fig. 1C) cells were induced in active TB but not in LTBI or TST- individuals ( $p < 0.05$ ). No differences were observed in double-positive (IFN- $\gamma$ +IL-17+) CD8+ T cells between all groups (Fig. 1A and data not shown). The specific Tc1/Tc17 ratio was significantly higher in TB patients (Fig. 1D) compared with LTBI and TST- individuals ( $p < 0.05$ ). Therefore, during active TB, specific Tc1 and Tc17 cells were generated.

Levels of IL-6 in the plasma of all individuals involved in this study were quantified. We observed that TB patients had higher levels compared with LTBI or TST- individuals (Fig. 1E;  $p < 0.05$ ). Thus, active TB infection induced Tc1 and Tc17 cells and increased IL-6 levels.

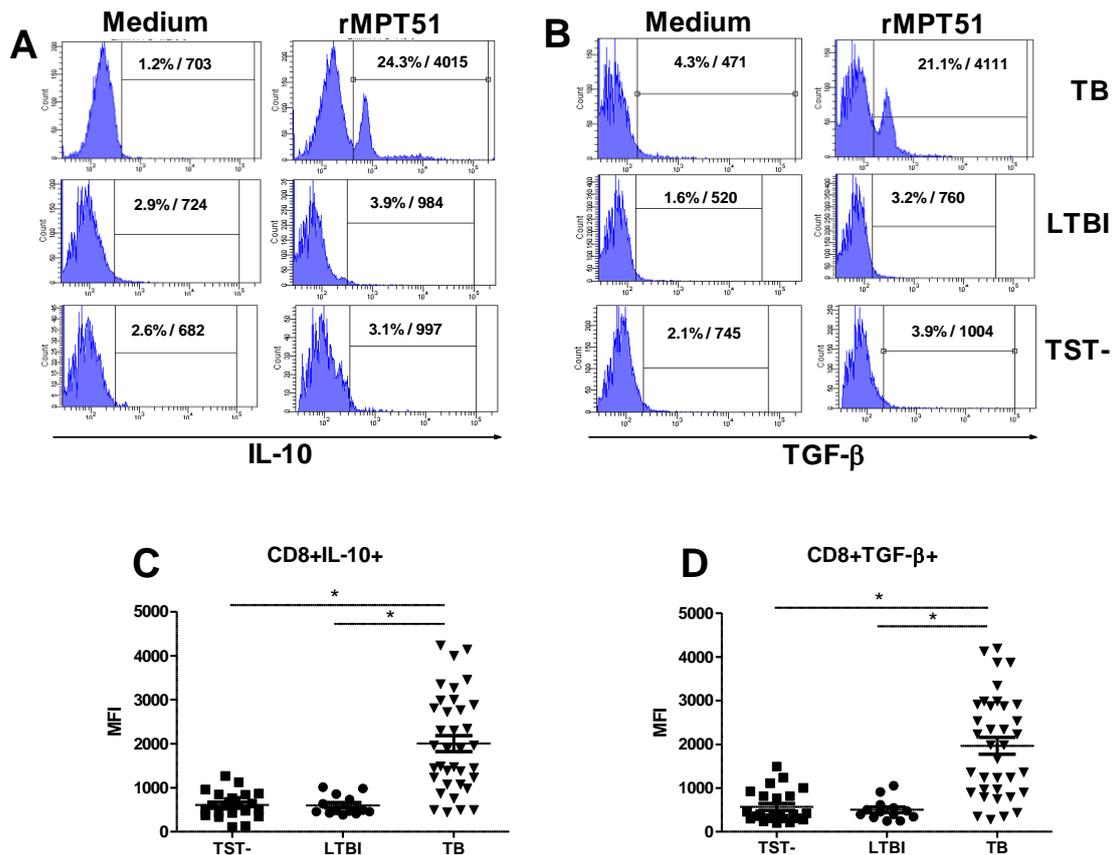
### *Specific expression of IL-10 and TGF- $\beta$ by CD8+ T cells in active tuberculosis*

In addition to their proinflammatory functions, we investigated whether CD8+ T cells had an anti-inflammatory role in active TB. Expression of IL-10 and TGF- $\beta$  is shown in Fig. 2. Both cytokines (IL-10; Fig. 2A and C and TGF- $\beta$ ; Fig. 2B and D) were induced in CD8+ T cells from TB patients in response to the Mtb antigen, when compared with LTBI or TST- individuals ( $p < 0.05$ ). Consequently, these results indicate that CD8+ T cells from active TB patients produce regulatory cytokines.



**Figure 1.** Analysis of CD8<sup>+</sup> T cells expressing IFN- $\gamma$  and IL-17 and plasma levels of IL-6 in individuals with TB, LTBI, and TST-. PBMC were cultured with medium alone, PHA (2  $\mu$ g/mL) or rMPT51 (2  $\mu$ g/mL) for 96 h and the expression of cytokines were analyzed by flow

cytometry. A – Representative FACS plot of IFN- $\gamma$  and IL-17 expression in CD8+ T cells after stimulation with medium alone, PHA or rMPT51. IgG1 was used as an isotype control. B – Percentage of specific Tc1 (CD8+ IFN- $\gamma$ +) cells among TB, LTBI, and TST- individuals. C – Percentage of specific Tc17 (CD8+ IL-17+) cells among TB, LTBI, and TST- individuals. D – Ratio of Tc1/Tc17 cells. E – Plasma levels of IL-6 among TB, LTBI, and TST- individuals. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Significant differences between the groups (\*  $p < 0.05$ ).



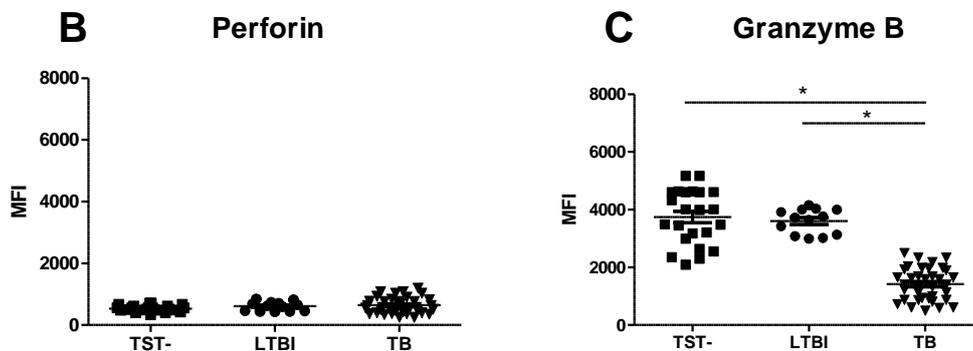
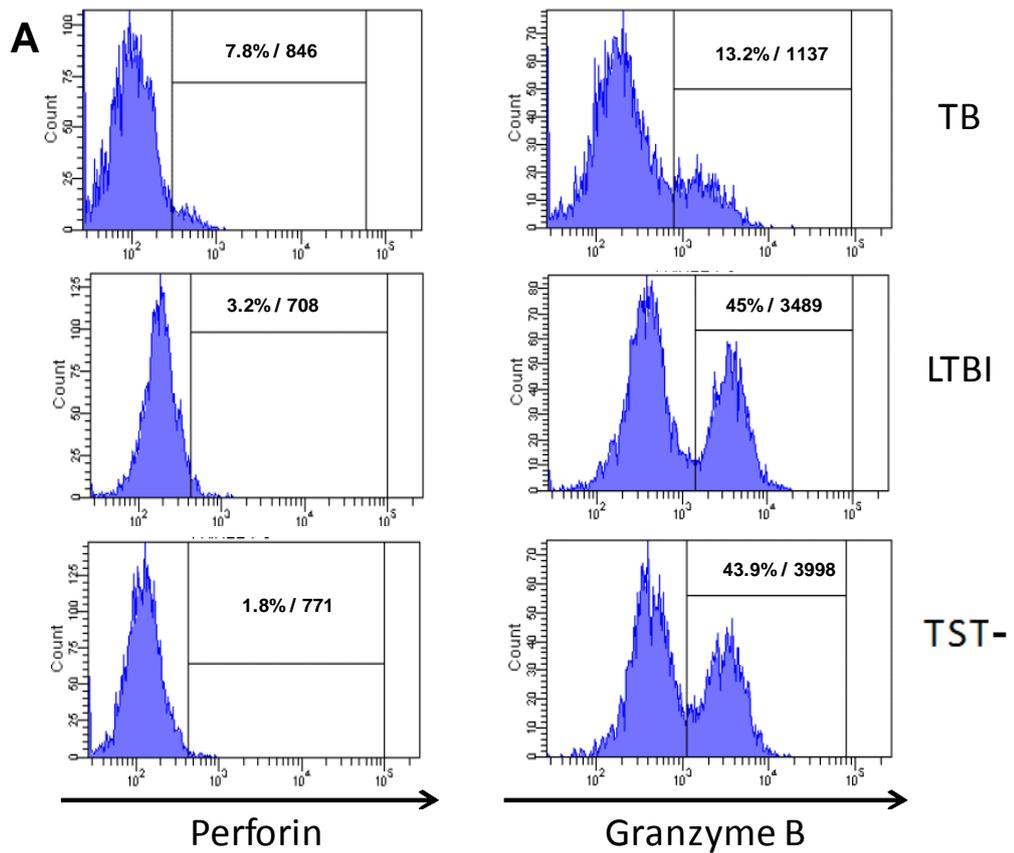
**Figure 2. Specific expression of IL-10 and TGF- $\beta$  by CD8+ T cells in TB, LTBI, and TST-.** PBMC were cultured with medium alone, PHA (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or rMPT-51 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 96 h and the expression of cytokines was analyzed by flow cytometry. Representative FACS plot of mean fluorescence intensity (MFI) of IL-10 (A) and TGF- $\beta$  (B) expression from CD8+ T cells of TB patients and LTBI or TST- individuals stimulated with medium and rMPT51 are shown. The range gate was set using PBMC cultures without stimulation (medium) for each subject. The numbers are the percentage of CD8+ T cells positive for each cytokine and the mean fluorescence intensity of this population. C – Specific IL-10 MFI of CD8+ T cells from TB patients and LTBI and TST- individuals. D – Specific TGF- $\beta$  MFI of CD8+ T cells from TB patients and LTBI and TST- individuals. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Bars show significant differences between the groups (\*  $p < 0.05$ ).

### *Cytotoxic granules of CD8+ T cells in tuberculosis*

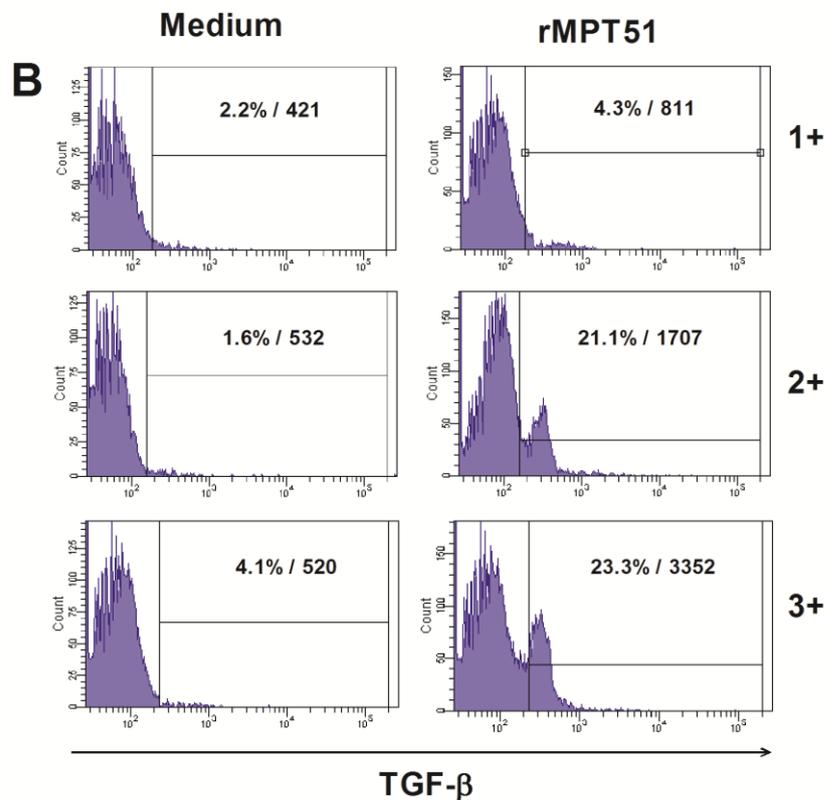
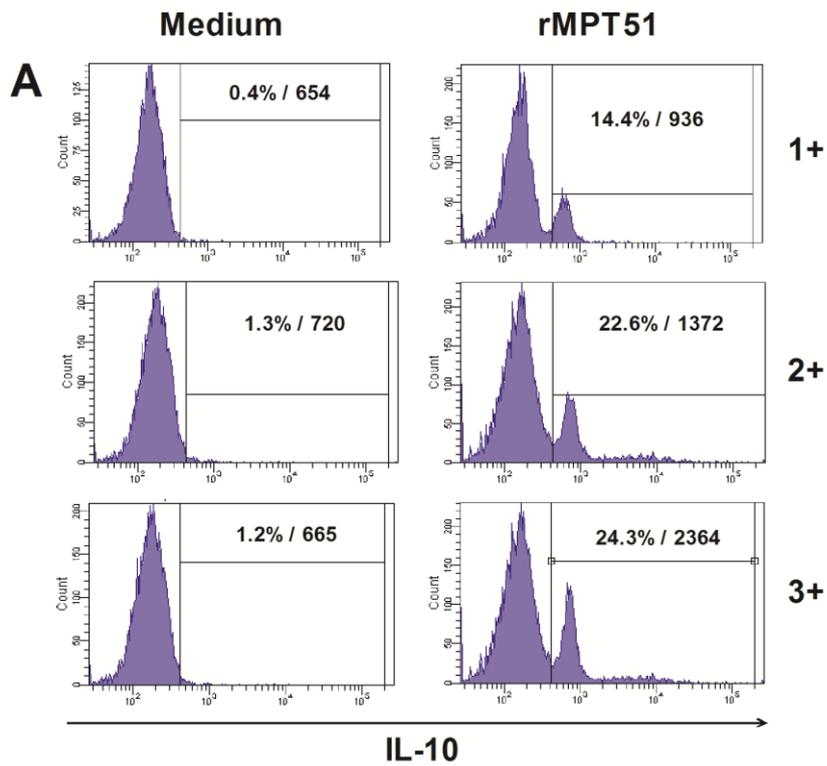
Next, we investigated whether CD8+ T cells from TB patients had a cytolytic molecules. We analyzed perforin and granzyme-B expression *ex vivo* in CD8+ T cells from patients with active TB, LTBI, and TST- individuals. No difference was observed when perforin expression was analyzed (Fig. 3A and B). However, granzyme-B expression was down-regulated in CD8+ T cells from active TB patients (Fig. 3A, and C,  $p < 0.05$ ). Overall, these results indicate that TB patients contain CD8+ T cells with cytolytic properties, although granzyme-B expression was impaired. In order to discard if this phenomenon was associated with a reduced CD8+ T cell population among pulmonary TB patients, the percentages of CD8+ T cells in the peripheral blood among TB, LTBI, and TST- and the total numbers of CD8+ T cells were evaluated. TB patients presented higher numbers of CD8+ T cells (Table 1) when compared with LTBI or TST- ( $p < 0.05$ ) while the percentages were similar.

### *Bacillary load is associated with CD8+ T-cell phenotype*

The bacillary load in the sputum smear of TB patients was used to classify the patients according to the different CD8+ T-cell phenotypes described in this study. For this, TB patients were stratified according to sputum smear grade of low (1+), medium (2+), or high (3+) bacillary load. The CD8+ T-cell expression of IL-10 (Fig. 4A and 5A) and TGF- $\beta$  (Fig. 4B and Fig 5B) was proportional to the bacillus quantity in the smear from TB patients. A positive correlation between IL-10 and TGF- $\beta$  expression was observed ( $r^2 = 0.60$ ) among all TB individuals. There was also a clear positive association of the bacillary load and the expression of those anti-inflammatory cytokines production by CD8+ T cells (Fig. 5C). Conversely, IFN- $\gamma$ + or IL-17+, CD8 T-cell numbers were similar among the studied groups, independent of the sputum bacillary load (Fig. 5D and E). Paradoxically, the expression of granzyme-B in CD8+ T cells diminished as the bacillary load increased in TB patients (Fig. 5F). These data indicate that patients with higher bacillary load in the sputum presented CD8+ T cells with a regulatory phenotype and diminished granzyme-B expression.

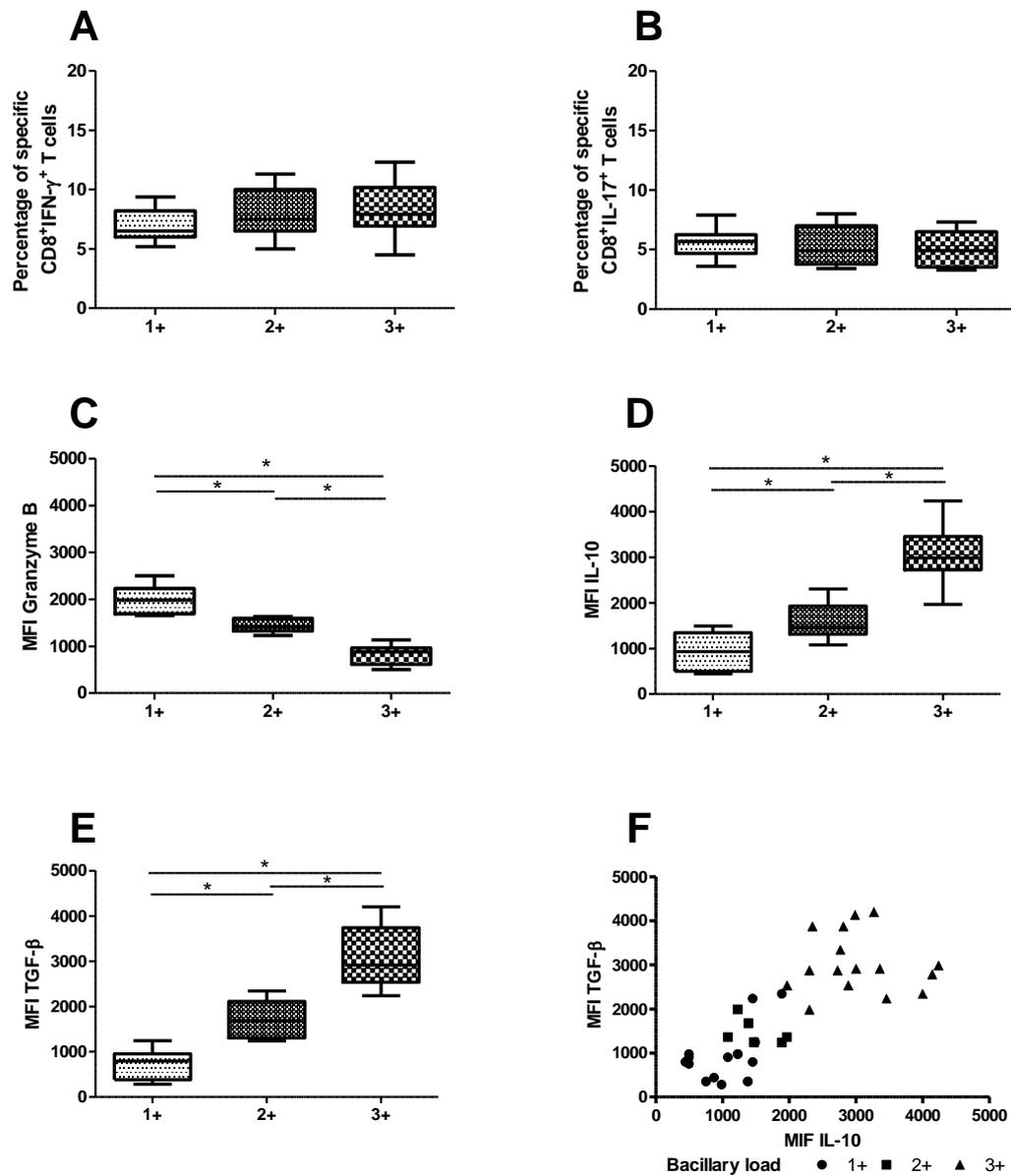


**Figure 3. *Ex vivo* expression of perforin and granzyme-B from CD8+ T cells in TB, LTBI, and TST- individuals.** PBMC were obtained from all individuals and the expression of cytokines was analyzed by flow cytometry. A – Representative FACS plot of perforin and granzyme-B expression from CD8+ T cells. The numbers are the percentage of CD8+ T cells positive for each cytokine and the mean fluorescence intensity of this population. B – *Ex vivo* perforin mean fluorescence intensity (MFI) of CD8+ T cells from TB patients and LTBI or TST- individuals. C – *Ex vivo* MFI of granzyme-B in CD8+ T cells from TB patients and LTBI or TST- individuals. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Bars show significant differences between the groups (\*  $p < 0.05$ ).



**Figure 4. Representative histogram flow plots of CD8+ T cells expressing IL-10 and TGF- $\beta$  from TB patients stratified according to the bacillary load.** TB patients were stratified according to sputum smear grade of low (1+), medium (2+), or high (3+) bacillary load. The range gate was set using PBMC cultures without stimulation (medium) for each subject. The numbers are the percentage of CD8+ T cells positive for each cytokine and the mean fluorescence

intensity of this population. A – Representative flow plots of CD8+ T cells expressing IL-10. B – Representative flow plots of CD8+ T cells expressing TGF- $\beta$ .



**Figure 5. Expression of IFN- $\gamma$ , IL-17, granzyme-B, IL-10 and TGF- $\beta$ , from CD8+ T cells of TB patients according to bacillary load.** TB patients were divided according to sputum smear grading: 1+ (n=14), 2+ (n=6), and 3+ (n=16). The phenotypes of CD8+ T cells were associated with the sputum smear grade of bacillary load (A – Tc1, B – Tc17, C – granzyme-B, D – IL-10, E – TGF- $\beta$ , F – relationship between IL-10 and TGF- $\beta$  CD8+ T cells expression: expressed as the mean fluorescence intensity (MFI)). Box plots show the mean  $\pm$  SEM. Bars show significant differences between the groups (\* p < 0.05).

## Discussion

In this study, we analyzed the specific expression of IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, and TGF- $\beta$  cytokines and the *ex vivo* expression of perforin and granzyme-B in CD8<sup>+</sup> T cells from TB, LTBI, and TST- individuals. The phenotypes observed in CD8<sup>+</sup> T cells were associated with bacillary load of Mtb in sputum smears from TB patients. Our results demonstrate that specific Tc1 and Tc17 cells are induced in active TB but not in LTBI or TST-. In addition, TB patients presented with a higher expression of IL-10 and TGF- $\beta$  from CD8<sup>+</sup> T cells in contrast to the lower expression of granzyme-B. When these phenotypes were evaluated according to smear grade of bacillary load, TB patients with a higher smear grade had increased IL-10 and TGF- $\beta$  expression and reduced expression of granzyme-B in CD8<sup>+</sup> T cells. This is the first study, to the best of our knowledge, to demonstrate specific CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17 in the peripheral blood of active TB patients and the direct association of different CD8<sup>+</sup> T-cell phenotypes with the smear grade of bacillary load in TB patients.

The specific immunity to different Mtb antigens has been studied thoroughly. Some of those antigens, as for example MPT51, was shown to discriminate patients with active TB from healthy individuals by cellular and/or humoral responses (DE ARAUJO-FILHO et al., 2008; MELO CARDOSO ALMEIDA et al., 2008), specially in HIV infected TB patients (ACHKAR et al., 2006; ACHKAR et al., 2010). Previously we have shown that stimulating PBMC from TB patients with MPT51, CD8<sup>+</sup> T cells were induced to produce both IL-10 and IFN- $\gamma$  in similar levels as other antigens, like ESAT-6 and Ag85 (DE ARAUJO-FILHO et al., 2008). Therefore justifying its use to evaluate CD8<sup>+</sup> T cell cytolytic response. The MPT51 antigen is a protein of 27kDa characterized as a non-catalytic  $\alpha/\beta$  hydrolase that is involved in *M. tuberculosis* adhesion mechanisms contributing to the virulence, being produced in both active and latent phases of the disease (WILSON et al., 2004).

IFN- $\gamma$  expression from CD8<sup>+</sup> T cells of patients with active TB reinforced the evidence that IFN- $\gamma$  is crucial for immune responses to control Mtb during the active phase of the disease (FLYNN; CHAN, 2001; BORGSTROM et al., 2012; JURADO et al., 2012; KASSA et al., 2012) and can be produced by different cells (FLYNN; CHAN, 2001; AL-ATTIYAH; EL-SHAZLY; MUSTAFA, 2012). In addition, CD8<sup>+</sup> T cells from TB patients were positive for IFN- $\gamma$  independently of the sputum bacterial load or the

expression of IL-17 (Fig. 1 and 5A). However, TB severity was not associated with IFN- $\gamma$ + or IL-17+ by CD8+ T cells different from what was observed with CD4+IFN- $\gamma$ +IL-17+ T cells that increased levels in active TB patients and correlates with the severity of the disease (JURADO et al., 2012).

The presence of CD8+ T cells expressing IL-17 in patients with active TB may be explained by high levels of IL-6 in the plasma of TB patients, which contributes to Th17 and Tc17 cell differentiation (MCGEACHY et al., 2007; TAJIMA et al., 2008; CIRIC et al., 2009), which is highly prevalent in TB (DUTTA et al., 2012). During the active phase of TB infection, a large number of cells are activated, leading to high levels of inflammatory cytokines that contribute to the activation of cell subpopulations that produce IL-17. This might be specific to patients with active TB. The presence of Tc17 cells in active TB suggests they might be involved in the immunopathogenesis of TB, as has been demonstrated for Th17 cells (SCRIBA et al., 2008) and indicates that CD8+ T cells are involved in immune responses against Mtb.

Increased numbers of Tc17 and IL-6 cells in TB patients together with Tc1 cells can promote the development of other cell populations that produce regulatory cytokines to compensate for the inflammatory process, as shown for CD4+ T cells (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; HOUGARDY et al., 2007). Importantly, effective suppression by regulatory T cells was only reported in IFN- $\gamma$ + cells, but the suppression of IL-17 by Treg cells has not been shown (MCGEACHY et al., 2007; TAJIMA et al., 2008; CIRIC et al., 2009). The presence of regulatory cytokines in TB immunology generally correlates with an attempt to control tissue damage caused by inflammatory cytokines in response to Mtb (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006).

Currently, the role of CD8+ T cells in TB is thought to involve their cytolytic activity mediated by cytotoxic granules (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008; ROZOT et al., 2013). The reduced level of granzyme-B granules observed here was associated with an increase in the bacillary load and this fact may contribute to the multiplication of the bacillus because granzyme-B activates caspases such as caspase-3 and the mitochondrial infected cell death pathways (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). This observation suggests that during active TB, CD8+ T cells develop a potential granzyme-B-independent cytotoxic mechanism involving Fas-L and/or TNFR pathways (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008). Rozot et al. (2013) observed different results, but they analyzed the expression of granzyme-B in Mtb-specific CD8+ T cells producing

IFN- $\gamma$ , which may have generated these discordant results (ROZOT et al., 2013). Confirming our results, the down-regulation of cytotoxic granules in CD8<sup>+</sup> T cells was associated with *Chlamydia* infection (IBANA et al., 2012).

Next, we investigated whether the bacillary load in sputum smears from TB patients is correlated with the phenotypes of CD8<sup>+</sup> T cells described in this study. The mechanism of cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells is dependent on perforin and we did not find significant differences in the expression of perforin by CD8<sup>+</sup> T cells between analyzed groups because it was not correlated with the bacterial load, since it has been demonstrated that this molecule is involved in the response against Mtb in humans (ROZOT et al., 2013). Independent of the severity of disease, the numbers of CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  and IL-17 was not altered, reinforcing the idea that these cytokines participate in the pathogenesis of TB (JURADO et al., 2012). However, the specific expression of IL-10 and TGF- $\beta$  by CD8<sup>+</sup> T cells was significantly increased in TB patients with a high bacillary load. Although a direct correlation between categorical and numerical variables is difficult to evaluate, a relationship between the increase of MFI from both cytokines was associated to the bacillary load, suggesting that those cytokines expression on CD8<sup>+</sup> T cells might be correlated with the immune exhaustion discussed by others researchers (Fig. 5) (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008; JURADO et al., 2012). The functional capacity of Mtb-specific T-cell responses in humans is associated with the mycobacterial load when observed for polyfunctional T cells. However, this was not observed for IL-17, IL-10, TGF- $\beta$ , and granzyme-B expression in CD8<sup>+</sup> T cells (DAY et al., 2011). The expression of granzyme-B in CD8<sup>+</sup> T cells was decreased while the bacillary load increased. The down-regulation of cytotoxic granules in CD8<sup>+</sup> T cells is associated with the severity of *Chlamydia* infection (IBANA et al., 2012) similar to what might happen in active TB. The presence of cavitations observed in 62.5% (n=10) of patients with a high bacillary load (3+) indicates that disease severity contributes to the generation of different CD8<sup>+</sup> T-cell phenotypes in active TB (GOPI et al., 2006; HESSELING et al., 2010; RALPH et al., 2010).

It is important to emphasize that the results observed here were directly related with the type of TB (pulmonary), the bacillary load, and the presence of cavities in the lungs of available patients, but not to the generation of necrosis and/or apoptosis in lung tissue. Thus, the appearance of CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations might be to counterbalance inflammation generated in response to Mtb at the tissue level.

Our study has several limitations including the small number of enrolled patients that voluntarily accepted to participate, corresponding to about 60% of the consecutively attending patients at the outpatient clinic of Hospital das Clínicas, HDTAA and CAIS Nova Era, governmental hospitals, and medical centers during the recruitment period. However, we believe this did not influence the outcome of our analysis.

In conclusion, our study suggests that during active TB, many CD8<sup>+</sup> T-cell phenotypes are induced and that the bacillary load in sputum smears from TB patients can be associated with these phenotypes. Thus, our results represent a step forward in understanding the role of CD8<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of tuberculosis and provide new insights on different functional and phenotypic profiles of CD8<sup>+</sup> T cells induced in an active disease. However, to clarify the mechanisms involved, further studies are required.

### **Acknowledgments**

The authors thank the Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular of FARMATEC/UFG for cytometer support. The authors also thank many additional members of the Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas and Laboratório de Bacteriologia Molecular of IPTSP/UFG team who helped with patient enrollment and the evaluation of participants, and finally, the participants themselves.

This work was funded by CNPq (grant no. 575907/2008-8 and 301976/2011-2) and FAPEG/PRONEX (grants no. 200910267000446) in Brazil.

### **References**

ACHKAR, J. M.; DONG, Y.; HOLZMAN, R. S.; BELISLE, J.; KOURBETI, I. S.; SHERPA, T.; CONDOS, R.; ROM, W. N.; LAAL, S. Mycobacterium tuberculosis malate synthase- and MPT51-based serodiagnostic assay as an adjunct to rapid identification of pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 11, p. 1291-1293, 2006.

ACHKAR, J. M.; JENNY-AVITAL, E.; YU, X.; BURGER, S.; LEIBERT, E.; BILDER, P. W.; ALMO, S. C.; CASADEVALL, A.; LAAL, S. Antibodies against immunodominant antigens of Mycobacterium tuberculosis in subjects with suspected tuberculosis in the United States compared by HIV status. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 3, p. 384-392, 2010.

AL-ATTIYAH, R.; EL-SHAZLY, A.; MUSTAFA, A. S. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. **Scand J Immunol**, v. 75, n. 6, p. 623-632, 2012.

BEHAR, S. M. Antigen-specific CD8(+) T cells and protective immunity to tuberculosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 783, n., p. 141-163, 2013.

BORGSTROM, E.; ANDERSEN, P.; ATTERFELT, F.; JULANDER, I.; KALLENIUS, G.; MAEURER, M.; ROSENKRANDS, I.; WIDFELDT, M.; BRUCHFELD, J.; GAINES, H. Immune responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA and multiplex technology for diagnosis of *M. tuberculosis* infection; IP-10 is a promising marker. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e43438, 2012.

BOUSSIOTIS, V. A.; TSAI, E. Y.; YUNIS, E. J.; THIM, S.; DELGADO, J. C.; DASCHER, C. C.; BEREZOVSKAYA, A.; ROUSSET, D.; REYNES, J. M.; GOLDFELD, A. E. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **J Clin Invest**, v. 105, n. 9, p. 1317-1325, 2000.

CIRIC, B.; EL-BEHI, M.; CABRERA, R.; ZHANG, G. X.; ROSTAMI, A. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. **J Immunol**, v. 182, n. 9, p. 5296-5305, 2009.

DAY, C. L.; ABRAHAMS, D. A.; LERUMO, L.; JANSE VAN RENSBURG, E.; STONE, L.; O'RIE, T.; PIENAAR, B.; DE KOCK, M.; KAPLAN, G.; MAHOMED, H.; DHEDA, K.; HANEKOM, W. A. Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2222-2232, 2011.

DE ARAUJO-FILHO, J. A.; VASCONCELOS, A. C., JR.; MARTINS DE SOUSA, E.; KIPNIS, A.; RIBEIRO, E.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Cellular responses to MPT-51, GlcB and ESAT-6 among MDR-TB and active tuberculosis patients in Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 88, n. 5, p. 474-481, 2008.

DE KANTOR, I.N.; KIM, I.; FRIEDEN, S.J.; LASZIO, T.R.; LUELMO, F. Laboratory services in tuberculosis control. Geneva: World Healthy Organization:1998.

DUTTA, R. K.; KATHANIA, M.; RAJE, M.; MAJUMDAR, S. IL-6 inhibits IFN-gamma induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 6, p. 942-954, 2012.

EWEN, C. L.; KANE, K. P.; BLEACKLEY, R. C. A quarter century of granzymes. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 28-35, 2012.

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

GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL: SURVEILLANCE, PLANNING, FINANVING. WHO report 2012. Geneva, Switzerland:WHO; 2012.

GOPI, P. G.; CHANDRASEKARAN, V.; SUBRAMANI, R.; SANTHA, T.; THOMAS, A.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, P. R. Association of conversion & cure with initial smear grading among new smear positive pulmonary tuberculosis patients treated with Category I regimen. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 6, p. 807-814, 2006.

HARARI, A.; ROZOT, V.; BELLUTTI ENDERS, F.; PERREAU, M.; STALDER, J. M.; NICOD, L. P.; CAVASSINI, M.; CALANDRA, T.; BLANCHET, C. L.; JATON, K.; FAOUZI, M.; DAY, C. L.; HANEKOM, W. A.; BART, P. A.; PANTALEO, G. Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 372-376, 2011.

HESSELING, A. C.; WALZL, G.; ENARSON, D. A.; CARROLL, N. M.; DUNCAN, K.; LUKEY, P. T.; LOMBARD, C.; DONALD, P. R.; LAWRENCE, K. A.; GIE, R. P.; VAN HELDEN, P. D.; BEYERS, N. Baseline sputum time to detection predicts month two culture conversion and relapse in non-HIV-infected patients. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 14, n. 5, p. 560-570, 2010.

HOUGARDY, J. M.; PLACE, S.; HILDEBRAND, M.; DROWART, A.; DEBRIE, A. S.; LOCHT, C.; MASCART, F. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 4, p. 409-416, 2007.

IBANA, J. A.; MYERS, L.; PORRETTA, C.; LEWIS, M.; TAYLOR, S. N.; MARTIN, D. H.; QUAYLE, A. J. The major CD8 T cell effector memory subset in the normal and Chlamydia trachomatis-infected human endocervix is low in perforin. **BMC Immunol**, v. 13, n., p. 66, 2012.

JURADO, J. O.; PASQUINELLI, V.; ALVAREZ, I. B.; PENA, D.; ROVETTA, A. I.; TATEOSIAN, N. L.; ROMEO, H. E.; MUSELLA, R. M.; PALMERO, D.; CHULUYAN, H. E.; GARCIA, V. E. IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. **J Leukoc Biol**, v. 91, n. 6, p. 991-1002, 2012.

KASSA, D.; RAN, L.; GEBEREMESKEL, W.; TEBEJE, M.; ALEMU, A.; SELASE, A.; TEGBARU, B.; FRANKEN, K. L.; FRIGGEN, A. H.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; OTTENHOFF, T. H.; WOLDAY, D.; MESSELE, T.; VAN BAARLE, D. Analysis of immune responses against a wide range of Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 12, p. 1907-1915, 2012.

KONDO, T.; TAKATA, H.; MATSUKI, F.; TAKIGUCHI, M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 1794-1798, 2009.

KUMAR, N. P.; GOPINATH, V.; SRIDHAR, R.; HANNA, L. E.; BANUREKHA, V. V.; JAWAHAR, M. S.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. IL-10 dependent suppression of type 1, type 2 and type 17 cytokines in active pulmonary tuberculosis. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59572, 2013.

LI, X.; ZHOU, Q.; YANG, W. B.; XIONG, X. Z.; DU, R. H.; ZHANG, J. C. Pleural mesothelial cells promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in tuberculous pleural effusion. **J Clin Immunol**, v. 33, n. 4, p. 775-787, 2013.

MCGEACHY, M. J.; BAK-JENSEN, K. S.; CHEN, Y.; TATO, C. M.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D. J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol**, v. 8, n. 12, p. 1390-1397, 2007.

MELO CARDOSO ALMEIDA, C.; VASCONCELOS, A. C., JR.; KIPNIS, A.; ANDRADE, A. L.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Humoral immune responses of tuberculosis patients in Brazil indicate recognition of Mycobacterium tuberculosis MPT-51 and GlcB. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 3, p. 579-581, 2008.

NAM, J. S.; TERABE, M.; KANG, M. J.; CHAE, H.; VOONG, N.; YANG, Y. A.; LAURENCE, A.; MICHALOWSKA, A.; MAMURA, M.; LONNING, S.; BERZOFSKY, J. A.; WAKEFIELD, L. M. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. **Cancer Res**, v. 68, n. 10, p. 3915-3923, 2008.

PENG, Y.; HAN, G.; SHAO, H.; WANG, Y.; KAPLAN, H. J.; SUN, D. Characterization of IL-17<sup>+</sup> interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells in experimental autoimmune uveitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 9, p. 4153-4161, 2007.

PINHEIRO, M. B.; ANTONELLI, L. R.; SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; SPINDOLA-DE-MIRANDA, S.; GUIMARAES, T. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; TOLEDO, V. P. CD4-CD8-alpha-beta and gamma-delta T cells display inflammatory and regulatory potentials during human tuberculosis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50923, 2012.

POLLOCK, K. M.; WHITWORTH, H. S.; MONTAMAT-SICOTTE, D. J.; GRASS, L.; COOKE, G. S.; KAPEMBWA, M. S.; KON, O. M.; SAMPSON, R. D.; TAYLOR, G. P.; LALVANI, A. T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 208, n. 6, p. 952-968, 2013.

RALPH, A. P.; ARDIAN, M.; WIGUNA, A.; MAGUIRE, G. P.; BECKER, N. G.; DROGUMULLER, G.; WILKS, M. J.; WARAMORI, G.; TJITRA, E.; SANDJAJA; KENAGALEM, E.; PONTORORING, G. J.; ANSTEY, N. M.; KELLY, P. M. A simple, valid, numerical score for grading chest x-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. **Thorax**, v. 65, n. 10, p. 863-869, 2010.

RIBEIRO-RODRIGUES, R.; RESENDE CO, T.; ROJAS, R.; TOOSI, Z.; DIETZE, R.; BOOM, W. H.; MACIEL, E.; HIRSCH, C. S. A role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol**, v. 144, n. 1, p. 25-34, 2006.

ROBERTS, T.; BEYERS, N.; AGUIRRE, A.; WALZL, G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta, and interleukin-4 mRNA levels. **J Infect Dis**, v. 195, n. 6, p. 870-878, 2007.

ROZOT, V.; VIGANO, S.; MAZZA-STALDER, J.; IDRIZI, E.; DAY, C. L.; PERREAU, M.; LAZOR-BLANCHET, C.; PETRUCCIOLI, E.; HANEKOM, W.; GOLETTI, D.; BART, P. A.; NICOD, L.; PANTALEO, G.; HARARI, A. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 6, p. 1568-1577, 2013.

SCRIBA, T. J.; KALSDORF, B.; ABRAHAMS, D. A.; ISAACS, F.; HOFMEISTER, J.; BLACK, G.; HASSAN, H. Y.; WILKINSON, R. J.; WALZL, G.; GELDERBLOEM, S. J.; MAHOMED, H.; HUSSEY, G. D.; HANEKOM, W. A. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. **J Immunol**, v. 180, n. 3, p. 1962-1970, 2008.

SILVA, B. D.S.; ALVES, S.A.L.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Late diagnosis and TCD8 immune response profile of cutaneous tuberculosis: a case report. **Open J. Immunol**, v. 2, p. 125-131, 2012.

SILVA, B. D.; TANNUS-SILVA, D. G.; RABAHI, M. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. The use of Mycobacterium tuberculosis HspX and GlcB proteins to identify latent tuberculosis in rheumatoid arthritis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 29-37, 2014.

TAJIMA, M.; WAKITA, D.; NOGUCHI, D.; CHAMOTO, K.; YUE, Z.; FUGO, K.; ISHIGAME, H.; IWAKURA, Y.; KITAMURA, H.; NISHIMURA, T. IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells. **J Exp Med**, v. 205, n. 5, p. 1019-1027, 2008.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 455-462, 2010.

TZARTOS, J. S.; FRIESE, M. A.; CRANER, M. J.; PALACE, J.; NEWCOMBE, J.; ESIRI, M. M.; FUGGER, L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am J Pathol**, v. 172, n. 1, p. 146-155, 2008.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.

WILSON, R. A.; MAUGHAN, W. N.; KREMER, L.; BESRA, G. S.; FUTTERER, K. The structure of Mycobacterium tuberculosis MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. **J Mol Biol**, v. 335, n. 2, p. 519-530, 2004.

WOODWORTH, J. S.; WU, Y.; BEHAR, S. M. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8595-8603, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual of the national tuberculosis and leprosy programme; 2010.

## Late diagnosis and TCD8 immune response profile of cutaneous tuberculosis: A case report

Bruna Daniella de Souza Silva<sup>1</sup>, Sueli Lemes de Ávila Alves<sup>2</sup>, André Kipnis<sup>1</sup>, Ana Paula Junqueira-Kipnis<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia, Patologia e Parasitologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, Brazil; \*Corresponding Author: [apkipnis@gmail.com](mailto:apkipnis@gmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros LACEN/GO, Goiânia/GO, Brazil

Received 4 May 2012; revised 5 June 2012; accepted 14 June 2012

### ABSTRACT

**Introduction:** *Cutaneous tuberculosis (CTB)* is a rare form of extra-pulmonary tuberculosis that, when associated with late diagnosis, worsen the quality of life of the sick individuals. This report presents a case of late diagnosis of CTB. Unusual clinical manifestations retarded the correct tuberculosis diagnosis for more than a year. The immune response elicited by this type of tuberculosis as well as the factors that might contribute to the delay in diagnosis was evaluated and discussed. **Methodology:** Clinical evaluation and flow cytometric analyses of PBMC were realized for a case of CTB and a healthy individual as a control. **Results:** *M. tuberculosis* specific TCD8+ cell response was analyzed by flow cytometry and revealed positive cells for IL-17, IL-10, TGF- $\beta$  and IDO. The CTB patient presented higher percentage of those cells when compared to a healthy donor. However, TCD8 cells positive for the important protective cytokine, IFN- $\gamma$  was decreased in the CTB patient. **Conclusion.** The assessment of the *M. tuberculosis* specific TCD8+ immune response showed a regulatory/modulatory phenotype with a reduced IFN- $\gamma$  response when compared to the healthy control that could have contributed to the CTB infection.

**Keywords:** *Cutaneous tuberculosis*; Late Diagnosis; CD8+ T Cells

### 1. INTRODUCTION

Tuberculosis is a chronic disease that affects millions of people in the world. It is a disease that can affect every organ of the body and consequently have equally diverse clinical manifestations, but the pulmonary form

is the most frequent. Cutaneous tuberculosis (CTB) is a rare form of extra-pulmonary tuberculosis that can be caused by *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and in certain conditions by the attenuated *M. bovis-BCG* [1]. Despite its rare frequency, CTB correct diagnosis and management are fundamental, both for the patient as well as for public health. Additionally, long lasting, misdiagnosed and/or untreated CTB can lead to the development of a variety of types of cancer [2].

The CTB clinical manifestations depend on many factors: the route of infection, the host immune status, and drug resistance and/or bacteria pathogenicity [3-6]. When infection occurs by laboratory accident caused by clinical samples or *M. tuberculosis* cultures injected directly into the skin, the CTB clinical morphological variants are verrucosa cutis (it manifests as a painless, solitary, purplish or brownish-red warty plaque that may extend peripherally causing central atrophy or form fissures that exude pus or keratinous material), lupus vulgaris (plaque type begins as discrete, redbrown papules that coalesce and form plaques with a slightly elevated verrucas border and central atrophy) or skin ulcers (chancres). A lymphatic or hematogenous disseminated miliary TB may cause CTB variants such as escrofuloderma (firm, painless, subcutaneous, red-brown nodules overlying an infected focus, which gradually enlarge and suppurate forming ulcers and sinus tracts that drain watery, purulent, or caseous material), lupus vulgaris (multiple, discrete, smooth 1 - 3 mm brown/red or brown-to-yellowish dome-shaped papules usually located on the face), and tuberculous abscesses (an inflammatory papule develops at the inoculation site and evolves into a firm, shallow, non-tender, nonhealing, undermined ulcer with a granulomatous base) as described before [2,7].

We report a case of cutaneous tuberculosis in a 50-year-old male patient with unusual clinical symptoms that consequently delayed the correct diagnosis for two years. The clinical evolutionary aspects of the disease and the cellular immune response against *M. tuberculosis*

antigen were evaluated. The difficulty in diagnosing extrapulmonary tuberculosis and the immune response associated to its development was reviewed and discussed.

## 2. CASE REPORT

A 50-year-old HIV-negative male reported the appearance of two papules of gelatinous consistency on the neck with pus secretion in a 12 months interval. The clinical suspicion of a tumor led to a cervical ultrasound analysis that accused two solid cystic firm lesions, with enlarged lymph nodes. CT scan also revealed enlarged lymph nodes in the neck. Removal of the lumps showed necrosis redirecting the diagnosis to an infection, thus an empirical treatment was prescribed: amoxicillin (250 mg) for 10 days, but resulted in no health improvement/resolution. A thoracic plain chest X-ray film showed normal results.

After eight months, the patient returned to the hospital and complained the appearance of other papules with similar morphology and size on the chest. Again, 10 days of amoxicillin (500 mg) was prescribed. Due to the unaltered clinical signs, two months later, a chest CTS was performed, and revealed the presence of cutaneous abscesses without lung alterations. A series of tests was conducted, in order to identify the etiology of the illness, but all of them showed negative results (Table 1). At this time, abscesses and lymph nodes were biopsied and the samples from the abscesses showed a chronic granulomatous inflammation with caseous necrosis. These lesions were positive for acid-fast bacilli.

Two years after the first clinical symptoms, and one

year after the first health assistance, a clinical diagnosis of cutaneous tuberculosis was made. Therefore, TSPOT.TB and tuberculin skin tests (TST) were performed and resulted positive. Culturing and performing biochemical tests of the lymph node samples confirmed *Mycobacterium tuberculosis*. The patient underwent standard treatment for TB with rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol for 2 months, followed by rifampicin and isoniazid for 4 months.

## 3. MATERIALS AND METHODS

In order to understand the immune factors that could have contributed for the CTB development and the unusual clinical findings, a 20 mL of blood sample with heparin was collected at the time of the CTB diagnostic. As control, blood from a healthy donor (TST-) matched by sex and age was recruited.

### 3.1. Peripheral Blood Mononuclear Cells and Cell Culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from CTB patient and TST negative control by Ficoll density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB). The cells were washed twice in saline and distributed in 96-well plates at  $2 \times 10^5$  cells/mL in RPMI 1640 medium (GIBCO, Invitrogen Corporation) supplemented with 2 mM glutamine, 10 Nm pyruvate, 2 mM amino acids, 50 µg/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated bovine serum. They were then incubated with recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigen (MPT-51, 1 µg/mL)

Table 1. CTB patient's laboratorial tests.

Laboratorial analysis	Test	Normal Value Range	Results	
X-ray of the spine	Normal	Normal	Normal	
Cytomegalovirus	IgG	13.8 U/mL	To 8 U/mL	Reagent
	IgM	2 U/mL	To 15 U/mL	Not Reagent
Toxoplasmosis	IgG	12.6 U/mL	To 10.5U/mL	Reagent
	IgM	Not Reagent	Not Reagent	Not Reagent
Amylase		30 U/L	22 - 80 U/L	Normal
	Direct	0.11 mg/mL	0 - 0.20 mg/mL	Normal
Bilirubin	Indirect	0.36 mg/mL	0.20 - 0.80 mg/mL	Normal
	Total	0.49 mg/mL	0.20 - 1.00 mg/mL	Normal
TGO	28 U/mL	To 37 U/mL	Normal	
TGP	31 U/mL	To 41 U/mL	Normal	
Leucogram	5700 mm <sup>3</sup>	4000 - 10,000 mm <sup>3</sup>	Normal	
Prothrombin test	11.9 s	11.1 s - 13.2 s	Normal	
VDRL	Not Reagent	Not Reagent	Not Reagent	

previously shown to be immunogenic for pulmonary TB patients [8] or with PHA (1 µg/mL) as positive control and cultivated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 96 hours in the presence of anti-CD3 (eBioscience). Cells stimulated with medium alone or anti-IgG1 and anti-CD3 were used as control.

### 3.2. Flow Cytometry

The following antibodies (Abs) were used for surface and intracellular staining for flow cytometry: IFN- $\gamma$ -FITC (BD Bioscience Pharmingen), IL-10-PE, IL-17-PE, CD8-APC (eBioscience), TGF- $\beta$ -PE (IQ Products) and IDO-FITC (Santa Cruz Biotechnology). The cells were also stained with PE-conjugated mouse IgG1 for isotype control. For flow cytometry analysis, medium alone, PHA or TB antigen stimulated cells were treated with Golgi Stop Solution (containing monensin-BD Biosciences Pharmingen), and after 4 h of further incubation, they were harvested for analysis. To perform surface and intracellular staining, the cells were treated with PBS containing 0.05% azide for 20 min. After centrifugation (3000 rpm for 10 min), the cells were stained at 4°C for 18 minutes with surface marker Abs (CD8-APC). Subsequently, the plates were washed twice with PBS containing 0.05% sodium azide and treated with PermFix (BD Pharmingen, San Jose, USA) for 18 min. For intracellular staining, the cells were permeabilized with Perm Wash buffer (BD Biosciences Pharmingen) and incubated at 4°C for 18 min with the following specific antibodies: IFN- $\gamma$ -FITC (BD Biosciences Pharmingen), IL-10-PE, IL-17-PE (eBioscience), TGF- $\beta$ -PE (IQ Products), and IDO-FITC (Santa Cruz Biotechnology). After washing, the samples were immediately analyzed on a FACSCanto II apparatus (Becton Dickinson, San Jose, USA) at the Farmatec/UFG (Goiás, Brazil). At least 50.000 events were acquired per sample. Data analysis was performed using FACSDiva software (BD Biosciences Becton Dickinson). All studies were approved by the Hospital of the Federal University of Goiás Ethics Committee (Goiás, Brazil), and informed consent was obtained from all participating subjects.

### 4. RESULTS

To address if the unusual development of cutaneous TB, in this patient, was due to a defective TCD8<sup>+</sup> immune response, specific TCD8<sup>+</sup> subsets responses were analyzed by flow cytometry. TCD8<sup>+</sup> cells were analyzed for specific expression of IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, TGF- $\beta$  and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) upon stimulation with *M. tuberculosis* antigens. The patient presented low percentage of *M. tuberculosis* antigen specific TCD8<sup>+</sup> cells producing IFN- $\gamma$  (0.7%) compared to healthy control (2.0%) (Figure 1). However, the patient presented higher percentage of *M. tuberculosis* antigen specific TCD8<sup>+</sup>

cells positive for IL-17 (10.9%), IL-10 (3.1%), TGF- $\beta$  (11.7%) and IDO (6.9%) when compared with TCD8<sup>+</sup> cells from the healthy donor (IL-17 = 2.3%; IL-10 = 1.2%; TGF- $\beta$  = 0.7%; IDO = 0.9%) (Figures 1 and 2).

### 5. DISCUSSION

Cutaneous tuberculosis is re-emerging in countries with high incidence of multidrug resistance pulmonary tuberculosis and HIV, as Brazil [3]. Manifestation of disseminated millitary tuberculosis and CTB is predominant in immunosuppressed individuals [7]. Those individuals need rapid diagnosis and prompt treatment. The first described case of CTB in Brazil was reported around the year 1950 [9]. Since then, there were rare cases reported in the literature [10-12]. Here we report a case of a patient that had a delayed diagnosis of CTB due to unusual clinical symptoms. Although rare cases of CTB have been reported worldwide, to our knowledge this is the first reported case in the Midwestern region of Brazil.

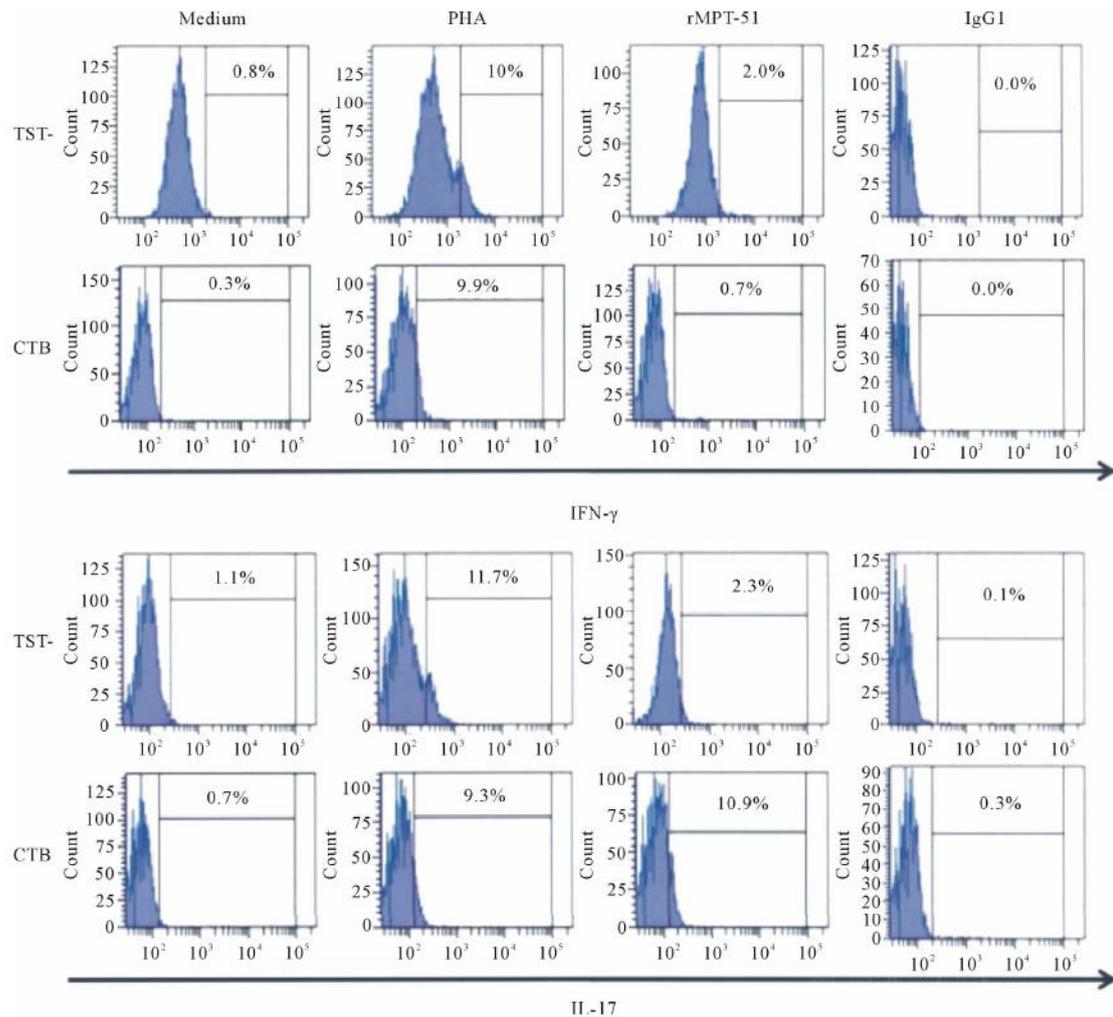
In the case reported here, the patient did not present a previous history of pulmonary TB (X ray had no TB scars), and the patient did not report any previous hospitalization or contact with TB patients, discarding also a direct skin contamination. His lesions were compatible to disseminated TB, and during the disease evolution, the patient always reported pain in the affected regions.

Diagnosis of CTB is a challenge, and requires the association between clinical findings and diagnostic laboratory tests. The usual laboratory tests are biopsies and *Mycobacterium sp* culture of the lesions, polymerase chain reaction (PCR) and acid-fast bacilli test (AFB) to identify the causal agent in the lesions [2,13]. Serological tests and TST (tuberculin skin test) has been used as complementary tests [2,14,15].

The delay in the diagnosis of CTB occurred mainly because of the unusual signs and symptoms presented by the patient. Initially papules or lesions similar to a skin cancer may have misled the physician interpretation, avoiding a suspicion of *M. tuberculosis* infection [2].

Although the pulmonary disease is the most common form of TB, extrapulmonary TB affects 10% - 20% of individuals [15]. Host defense against *M. tuberculosis* is mediated by combination of innate and adaptive immune responses and these responses consist in the activation of macrophages, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and B cells in both pulmonary and extra-pulmonary form [14,16].

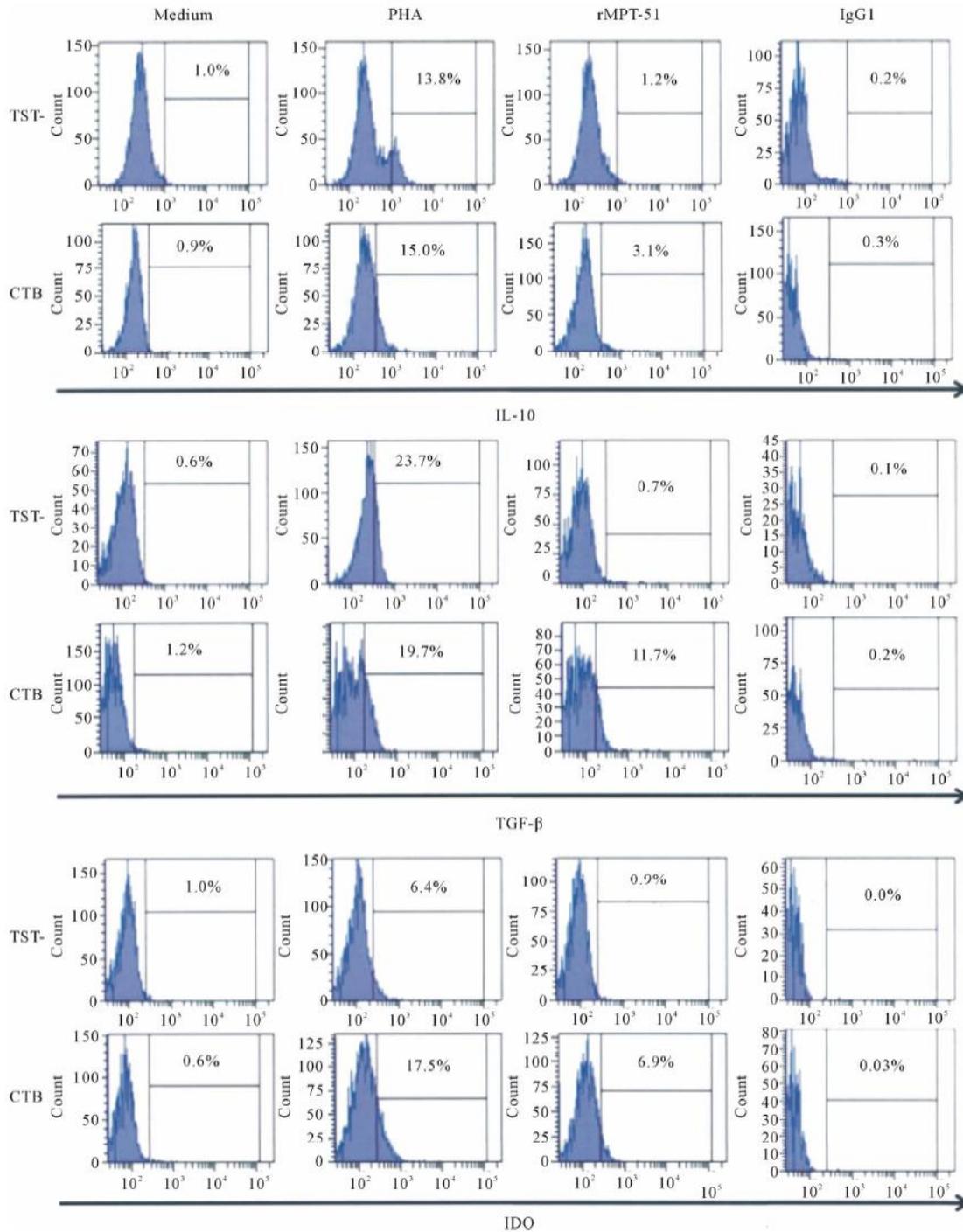
The protective immune response to TB depends mainly on the activation of T cells with a Th1 phenotype and macrophages, the latter being the primarily effector cells. Th1 cells are a subset of TCD4<sup>+</sup> cells that are responsible for producing a series of cytokines such as IFN- $\gamma$  and lymphotoxin- $\alpha$  that are essential for other cell activation [8,15]. IFN- $\gamma$  is the main cytokine involved in macro-



**Figure 1.** Histograms showing flow cytometry results of the percentage of specific TCD8<sup>+</sup> cells positive for IFN- $\gamma$  and IL-17 from a TST-healthy control and the CTB patient. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Science AB). The cells were washed twice in saline and distributed in 96-well plates a  $2 \times 10^5$  cells/mL in RPMI 1640 medium (GIBCO, Invitrogen Corporation) supplemented. They were then incubated with recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigen (MPT-51, 1  $\mu$ g/mL) or with PHA (1  $\mu$ g/mL) as positive control and cultivated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 96 hours in the presence of anti-CD3 (eBioscience). After the culture, the cells were treated with monoclonal antibodies anti-CD8 APC, anti-IFN- $\gamma$  FITC, anti-IL-17 PE and anti-IgG2 PE as a isotype control and acquired in a FACS-Canto and analyzed using FACS Diva software.

phage activation. Infected macrophages produce cytokines and chemokines that recruit other cells to the site of infection and, when previously activated by IFN- $\gamma$ , macrophages up regulate membrane MHC proteins and lysosome enzymes, among other molecules to increase bacterial killing [15]. As shown previously, pulmonary and extra pulmonary tuberculosis patients present specific TCD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -producing cells in response to PPD among other *M. tuberculosis* antigens [16], however, activation

of TCD4<sup>+</sup> cells does not directly correlates with disease protection or the clinical TB forms, creating the hypothesis that other cell population might be important in the establishment of the several TB clinical forms. TCD8<sup>+</sup> cells are known by its cytotoxic function, however it has been shown that TCD8<sup>+</sup> cells also produce IFN- $\gamma$  contributing to TB protection. Although some studies emphasize the TCD8<sup>+</sup> role in the murine model of infection, little is known in the human disease [18].



**Figure 2.** Histograms showing flow cytometry results of the percentage of specific TCD8+ cells positive for IL-10, TGF-β and IDO from TST-healthy control and CTB patient. The PBMC cells cultured as described in Figure 1 treated with monoclonal antibodies anti-CD8 APC, anti-IL-10 PE, anti-TGF-β PE, anti-IDO FITC and anti-IgG1 PE.

In the skin, site of *M. tuberculosis* infection for CTB, dendritic cells and resident macrophages could initiate the immune response and induce the activation of either intraepithelial or peripheral T cells. The intraepithelial lymphocytes are mainly CD8+ and have direct cytotoxic action on infected cells [17]. Many subsets of peripheral TCD8+ cells have been characterized in several diseases [19,20], but in TB their functions are yet unclear. CTB immune response characterization has been done by identification of the cells present in CTB lesions [2,13]. In the present case, macrophages, lymphocytes and giant cells were observed in the histopathological findings (data not shown) only one year after the patient sought health assistance.

Sehgal *et al.* (1992) described the presence of T CD4 and CD8 cells in the peripheral blood of CTB patients by immunohistochemistry and observed that the clinical manifestations affect the percentage of these cells in the blood [15]. Nevertheless, to date, no published data studied the role of TCD8 cells subtypes in CTB. TCD8+ cells contribute by destroying cells infected with the bacilli by the release of granules containing perforin and granzyme and also by activation of other cells through the production of various cytokines. Studies have demonstrated the participation of TCD4+ regulatory cells and TCD8+ cells positive for IDO (an enzyme that promotes tryptophan depletion) in the inhibition and/or down regulation of the immune response [21].

The results presented here revealed a specific TCD8 immune response to *M. tuberculosis* antigens by the CTB patient. The presence of TCD8 cells positive for IL-10 and TGF- $\gamma$ , which characterize a regulatory phenotype could account for the unusual clinical manifestation [4]. Furthermore, it was observed the presence of specific TCD8+IDO+ cells that could be inhibiting the proliferation of other cells involved in the immune response to *M. tuberculosis*. Although we cannot assure the immune statuses of the patient, these cytokines/molecules are known by their ability to down modulate macrophage and T cell functions [4,21], suggesting that the activity of these cells might be modified in the CTB patient.

## 6. CONCLUSION

A case of CTB patient with a delayed diagnosis is presented here. Unusual clinical manifestation was the main reason for the late diagnosis. The assessment of the *M. tuberculosis* specific TCD8+ immune response revealed a regulatory/modulatory phenotype with a reduced IFN- $\gamma$  response when compared to a healthy control.

## REFERENCES

- [1] Afsar, F.S., Afsar, I., Diniz, G., Asioly, S. and Sorguc, Y. (2008) *Lupus vulgaris* in a pediatric patient: A clinico-histopathological diagnosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **12**, 152-154. [doi:10.1590/S1413-86702008000200011](https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000200011)
- [2] Ljubenovic, M.S., Ljubenovic, D.B., Binic, I.I., Jankivic, A.S. and Jancic, S.A. (2011) *Cutaneous tuberculosis and squamous-cell carcinoma*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **86**, 514-514. [doi:10.1590/S0365-05962011000300017](https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300017)
- [3] Barbagallo, J., Tager, P., Ingleton, R., Hirsch, R.J. and Weinberg, J.M. (2002) *Cutaneous tuberculosis: Diagnosis and treatment*. *American Journal of Clinical Dermatology*, **3**, 319-328. [doi:10.2165/00128071-200203050-00004](https://doi.org/10.2165/00128071-200203050-00004)
- [4] De Jong, J.W. and Van Atlena, R. (2000) Non-respiratory tuberculosis with *Mycobacterium tuberculosis* after penetrating lesions of the skin: Five case histories. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **4**, 1184-1187.
- [5] Rajan, J., Mathai, A.M., Prasad, P.V.S. and Kaviarasan, P.K. (2011) *Multifocal tuberculosis verrucosa cutis*. *International Journal of Dermatology*, **56**, 332-334.
- [6] Orjuela, D., Puerto, G., Mejia, G., Castro, C., Garzon, M.C., Garcia, L.M., Hernandez, E., Ribon, W. and Rodrigues, G. (2010) *Cutaneous tuberculosis after mesotherapy: Report of six cases*. *Biomedica*, **30**, 321-326.
- [7] Frankel, A., Penrose, C. and Emer, J. (2009) *Cutaneous tuberculosis: A practical case report and review for the dermatologist*. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, **2**, 19-27.
- [8] Aratújo-Filho, J.A., Vasconcelos-Júnior, A.C., Sousa, E.M., Kipnis, A. and Junqueira-Kipnis, A.P. (2008) Cellular responses to MPT-51, GlcB and ESAT-6 among MDR-TB and active tuberculosis patients in Brazil. *Tuberculosis*, **88**, 474-481. [doi:10.1016/j.tube.2008.06.002](https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.06.002)
- [9] Azulay, R.D. and Azulay, J.D. (1955) First case of lupus vulgaris in Northeast Brazil. *An Bras Derm Sifilogr*, **30**, 195-202.
- [10] Guimaraes, N.A. (1957) *Cutaneous tuberculosis; aspects in Brazil*. *Revista Brasileira de Medicina*, **14**, 105-112.
- [11] Pereira, M.B., Gomes, M.K. and Pereira, F. (2000) *Tuberculosis verrucosa cutis associated with tuberculous lymphadenitis*. *International Journal of Dermatology*, **39**, 856-858. [doi:10.1046/j.1365-4362.2000.00095-4.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2000.00095-4.x)
- [12] Niemeyer-Corbellini, J.P., Spinatto, D., Boechat, N., Carvalho, A.C., Pineiro-Maceira, J. and Azulay, D.R. (2008) *Papulonecrotic tuberculid on the scalp*. *International Journal of Dermatology*, **47**, 1028-1032. [doi:10.1111/j.1365-4632.2008.03754.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03754.x)
- [13] Abdalla, C.M., De Oliveira, Z.N., Sotto, M.N., Leite, K.R., Canavez, F.C. and de Carvalho, C.M. (2009) *Polymerase chain reaction compared to other laboratory findings and to clinical evaluation in the diagnosis of Cutaneous tuberculosis and atypical mycobacteria skin infection*. *International Journal of Dermatology*, **48**, 27-35. [doi:10.1111/j.1365-4632.2009.03807.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.03807.x)
- [14] Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., *et al.* (1998) *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by*

- granulysin. *Science*, **282**, 121-125. [doi:10.1126/science.282.5386.121](https://doi.org/10.1126/science.282.5386.121)
- [15] Cooper, A.M. and Khader, S.A. (2008) The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological Reviews*, **226**, 191-204. [doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00702.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00702.x)
- [16] Montamat-Sicotte, D.J., Millington, K.A., Willcox, C.R., *et al.* (2011) A mycolic acid-specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. *The Journal of Clinical Investigation*, **121**, 2493-2503. [doi:10.1172/JCI46216](https://doi.org/10.1172/JCI46216)
- [17] Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F. and Takaguchi, M. (2008) Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17. *Journal of Immunology*, **182**, 1794-1798. [doi:10.4049/jimmunol.0801347](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801347)
- [18] Hirsch, C.S., Toossi, Z., Johnson, J.L., *et al.* (2001) Augmentation of apoptosis and interferon- $\gamma$  production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *Journal of Infectious Disease*, **183**, 779-788. [doi:10.1086/318817](https://doi.org/10.1086/318817)
- [19] Ciric, B., El-behi, M., Cabrera, R., Zhang, G. and Rostami, A. (2009) IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Immunology*, **182**, 5296-5305. [doi:10.4049/jimmunol.0900036](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900036)
- [20] Sehgal, V.N., Wagh, S.A., Bhattacharya, S.N. and Sharma, V.K. (1992) Peripheral T lymphocytes and their subsets in *Cutaneous tuberculosis*. *International Journal of Dermatology*, **31**, 110-112. [doi:10.1111/j.1365-4362.1992.tb03249.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1992.tb03249.x)
- [21] Sorensen, R.B., Hadrup, S.R., Svane, I.M., Hjortso, M.C., Straten, P. and Andersen, M.H. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. *Immunobiology*, **117**, 2200-2210.

## 7. DISCUSSÃO

---

Os artigos apresentados nesta tese abordaram aspectos clínicos, imunológicos e epidemiológicos associados à tuberculose pulmonar ativa, à tuberculose cutânea e à tuberculose latente em pacientes recrutados no Estado de Goiás. Na coorte de indivíduos incluídos neste estudo foi avaliado o perfil de resposta imune específica de linfócitos TCD8+ em pacientes com tuberculose pulmonar e em um paciente com tuberculose cutânea (caso clínico), uma forma rara de TB extrapulmonar. Este trabalho foi o primeiro a evidenciar um fenótipo regulador das células TCD8+ na tuberculose pulmonar ativa demonstrando que este fenótipo está relacionado com a carga bacilar desses pacientes. Esse mesmo fenótipo também foi verificado na tuberculose cutânea, e em conjunto, esses resultados sugerem que Mtb pode promover uma imunomodulação das células TCD8+ na tuberculose.

O Brasil é um país endêmico para a TB e apesar da incidência ser baixa em Goiás quando comparado aos demais estados do país, Goiânia e Aparecida de Goiânia são as duas cidades com maior índice de casos notificados (SVS/MS, 2013). Portanto, estudos que investiguem as relações entre Mtb e o hospedeiro podem contribuir para o entendimento da patogênese da doença em locais com diferentes endemicidades e dessa forma poderão contribuir com as metas da OMS na tentativa de impedir a cadeia de transmissão da doença e quem sabe um dia erradicá-la (WHO, 2013).

A resposta imune na tuberculose pulmonar ativa vem sendo extensivamente estudada. A caracterização das populações celulares envolvidas na resposta contra Mtb têm sido realizada na tentativa de desvendar os eventos ocorridos na interação entre o patógeno e o hospedeiro e permitir assim o advento do ser humano sobre esta bactéria milenar. Entretanto muito ainda precisa ser desvendado. A exemplo disso, o real papel dos linfócitos TCD8+ na doença ativa e na infecção latente ainda é alvo de muitos estudos.

As células TCD8+ possuem fundamental importância na resposta imune contra Mtb. Entretanto, o seu real papel nessa interação ainda permanece controverso. Sabe-se que a função das células TCD8+ é mediada por grânulos citotóxicos e por moléculas de expressão que promovem a morte das células infectadas com Mtb (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008; ROZOT et al., 2013). Contudo pesquisas recentes têm demonstrado outros papéis desempenhados pelos linfócitos TCD8+, como a produção de citocinas que

promovem a ativação ou a inibição de outras células (HARARI et al., 2011a; ROZOT et al., 2013; SILVA et al., 2014a). A carga bacilar também pode influenciar na resposta imune dos indivíduos com TB ativa e aqui nós observamos que a produção de citocinas reguladoras pelas células TCD8+ está envolvida com a carga bacilar do paciente, sugerindo que pode ser correlacionada com o esgotamento imune discutido por outros estudos (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008; JURADO et al., 2012). A gravidade da doença também pode contribuir para a geração de diferentes fenótipos de células T CD8+ na TB ativa (GOPI et al., 2006; HESSELING et al., 2010; RALPH et al., 2010).

É importante salientar que os resultados observados foram diretamente relacionados com o tipo de tuberculose (pulmonar), a carga bacilar e a presença de cavidades nos pulmões de pacientes incluídos neste estudo, mas não estão envolvidos com a geração de necrose e/ou apoptose no tecido pulmonar. Assim, o aparecimento de subpopulações de células TCD8+ com perfil regulador pode ter sido encontrado na tentativa do organismo de contrabalancear a inflamação gerada em resposta ao Mtb no tecido pulmonar (WOODWORTH; WU; BEHAR, 2008; JURADO et al., 2012; ROZOT et al., 2013). Essa mesma geração de células T reguladoras pode estar relacionada com a redução na expressão de grânulos citotóxicos, sugerindo um mecanismo compensatório na patogênese da doença, conforme demonstram nossos resultados de redução da expressão de granzima B nessas células.

Os linfócitos T possuem um papel importante no controle da TB e as citocinas produzidas pelas diferentes subpopulações de linfócitos pode afetar a resposta contra Mtb. Os linfócitos TCD4+ têm efetiva participação auxiliando outras células no direcionamento da resposta por meio da produção de citocinas, enquanto que os linfócitos TCD8+ além de produzir citocinas possuem ação citotóxica sobre as células infectadas. A resposta imune protetora contra Mtb é considerada a resposta com produção de IFN- $\gamma$ , principalmente por linfócitos TCD4+ e TCD8+. Entretanto, a indução de subpopulações de células TCD8+ produzindo citocinas reguladoras, como observado neste trabalho, pode gerar um desequilíbrio na resposta imune efetiva contra Mtb, contribuindo para o desenvolvimento de subpopulações reguladoras que induzem a diferenciação de células produtoras de citocinas anti-inflamatórias, corroborando assim com a efetiva proliferação de Mtb e conseqüentemente o desenvolvimento da doença ativa.

Uma das dificuldades no controle da transmissão da TB inicia-se na forma de contágio que se dá pelo ar. Devido a isso, a maioria dos casos de TB acomete o pulmão.

Entretanto, cerca de 10-20% podem afetar outros órgãos e causar as mais variadas formas de TB extrapulmonar (COOPER; KHADER, 2008). Em Goiás só em 2011, foram registrados 351 casos de TB extrapulmonar dentre os 793 casos novos notificados nesse mesmo ano (SES/GO, 2012). A forma mais rara de TB extrapulmonar é a cutânea que pode ser causada por *Mtb*, *M. bovis* e em certas condições *M. bovis*-BCG (AFSAR et al., 2008) onde as manifestações clínicas irão depender de vários fatores tais como a rota de infecção, a patogenicidade da bactéria, o status imune do hospedeiro, dentre outros (DE JONG; VAN ALTENA, 2000; BARBAGALLO et al., 2002; RAJAN et al., 2011). No caso clínico relatado, nós não observamos imunossupressão que pudesse justificar a causa de TB cutânea no paciente assim como não foi observado histórico ou sinais de tuberculose pulmonar prévia, evidenciando a dificuldade no diagnóstico das formas extrapulmonares de tuberculose.

A resposta imune envolvida na TB extrapulmonar é variada e depende do órgão afetado (ABDALLA et al., 2009). Pesquisas buscam evidenciar a interação entre o patógeno e as rotas de infecção na tentativa de revelar mecanismos imunopatogênicos de acordo com a instalação da infecção. Os trabalhos descritos na literatura com TB cutânea concentram-se em avaliar a anatomopatologia das lesões, com caracterização histopatológica do tecido afetado (BARBAGALLO et al., 2002; AFSAR et al., 2008; NIEMEYER-CORBELLINI et al., 2008). Poucos estudos descrevem a participação dos linfócitos T periféricos e suas funções na TB cutânea (SEHGAL et al., 1992; ABDALLA et al., 2009). Este é o primeiro estudo descrito na literatura que aborda o fenótipo das células TCD8+ na TB cutânea.

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho demonstram a variabilidade da resposta imune tanto de subpopulações celulares quanto na produção de citocinas envolvidas na resposta imune contra *Mtb* nas diferentes formas da doença (pulmonar ativa, latente ou extrapulmonar) reforçando a necessidade de novos estudos que busquem revelar a interação entre o patógeno e o hospedeiro na tentativa de contribuir para o entendimento da patogênese da doença.

## **8. CONCLUSÕES**

---

Um perfil regulador de células TCD8+ foi observado na tuberculose pulmonar ativa correlacionado com a carga bacilar.

A análise de células TCD8+ na tuberculose cutânea também demonstrou o mesmo perfil regulador, sugerindo a imunomodulação da resposta imune pelo Mtb independente do local de infecção.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDALLA, C. M.; DE OLIVEIRA, Z. N.; SOTTO, M. N.; LEITE, K. R.; CANAVEZ, F. C.; DE CARVALHO, C. M. Polymerase chain reaction compared to other laboratory findings and to clinical evaluation in the diagnosis of cutaneous tuberculosis and atypical mycobacteria skin infection. **Int J Dermatol**, v. 48, n. 1, p. 27-35, 2009.

ACHKAR, J. M.; DONG, Y.; HOLZMAN, R. S.; BELISLE, J.; KOURBETI, I. S.; SHERPA, T.; CONDOS, R.; ROM, W. N.; LAAL, S. Mycobacterium tuberculosis malate synthase- and MPT51-based serodiagnostic assay as an adjunct to rapid identification of pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 11, p. 1291-1293, 2006.

ACHKAR, J. M.; JENNY-AVITAL, E.; YU, X.; BURGER, S.; LEIBERT, E.; BILDER, P. W.; ALMO, S. C.; CASADEVALL, A.; LAAL, S. Antibodies against immunodominant antigens of Mycobacterium tuberculosis in subjects with suspected tuberculosis in the United States compared by HIV status. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 3, p. 384-392, 2010.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**, v. 17, n., p. 593-623, 1999.

AFSAR, F. S.; AFSAR, I.; DINIZ, G.; ASILSOY, S.; SORGUC, Y. Lupus vulgaris in a pediatric patient: a clinicohistopathological diagnosis. **Braz J Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 152-154, 2008.

AL-ATTIYAH, R.; EL-SHAZLY, A.; MUSTAFA, A. S. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. **Scand J Immunol**, v. 75, n. 6, p. 623-632, 2012.

ANDERSEN, P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. **Trends Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 7-13, 2007.

ANDRADE, M. R.; AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C.; ALMEIDA, F. M.; PERES, T. V.; LANES, V.; D'IMPERIO-LIMA, M. R.; LASUNSKAIA, E. B. Pathogenic Mycobacterium bovis strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiol**, v. 12, n., p. 166, 2012.

AOSHI, T.; NAGATA, T.; SUZUKI, M.; UCHIJIMA, M.; HASHIMOTO, D.; RAFIEL, A.; SUDA, T.; CHIDA, K.; KOIDE, Y. Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis, by MPT51 overlapping peptide screening. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1565-1571, 2008.

ARENS, R.; SCHOENBERGER, S. P. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. **Immunol Rev**, v. 235, n. 1, p. 190-205, 2010.

AZULAY, R. D.; AZULAY, J. D. [First case of lupus vulgaris in Northeast Brazil]. **An Bras Derm Sifilogr**, v. 30, n. 3, p. 195-202, 1955.

BANAIEE, N.; KINCAID, E. Z.; BUCHWALD, U.; JACOBS, W. R., JR.; ERNST, J. D. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. **J Immunol**, v. 176, n. 5, p. 3019-3027, 2006.

BARBAGALLO, J.; TAGER, P.; INGLETON, R.; HIRSCH, R. J.; WEINBERG, J. M. Cutaneous tuberculosis: diagnosis and treatment. **Am J Clin Dermatol**, v. 3, n. 5, p. 319-328, 2002.

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

BARNES, P. F.; GRISSE, C. L.; ABRAMS, J. S.; BAND, H.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 165, n. 3, p. 506-512, 1992.

BARRY, C. E., 3RD; BOSHOFF, H. I.; DARTOIS, V.; DICK, T.; EHRT, S.; FLYNN, J.; SCHNAPPINGER, D.; WILKINSON, R. J.; YOUNG, D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 845-855, 2009.

BEHAR, S. M. Antigen-specific CD8(+) T cells and protective immunity to tuberculosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 783, n., p. 141-163, 2013.

BERMUDEZ, L. E.; GOODMAN, J. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 4, p. 1400-1406, 1996.

BERMUDEZ, L. E.; SANGARI, F. J.; KOLONOSKI, P.; PETROFSKY, M.; GOODMAN, J. The efficiency of the translocation of Mycobacterium tuberculosis across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 1, p. 140-146, 2002.

BETTS, J. C.; LUKEY, P. T.; ROBB, L. C.; MCADAM, R. A.; DUNCAN, K. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 717-731, 2002.

BHATT, K.; HICKMAN, S. P.; SALGAME, P. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 2748-2751, 2004.

- BHATTACHARYYA, R.; SHUKLA, M.; NAGRA, S.; BANERJEE, D. Insights from the computational analysis of CD271 glycation in mesenchymal stem cells in diabetes mellitus as a predisposition to latent tuberculosis. **Bioinformatics**, v. 9, n. 16, p. 829-831, 2013.
- BIANCOTTO, A.; FENG, X.; LANGWEILER, M.; YOUNG, N. S.; MCCOY, J. P. Effect of anticoagulants on multiplexed measurement of cytokine/chemokines in healthy subjects. **Cytokine**, v. 60, n. 2, p. 438-446, 2012.
- BODMER, T.; STROHLE, A. Diagnosing pulmonary tuberculosis with the Xpert MTB/RIF test. **J Vis Exp**, v., n. 62, p. e3547, 2012.
- BORGSTROM, E.; ANDERSEN, P.; ATTERFELT, F.; JULANDER, I.; KALLENIOUS, G.; MAEURER, M.; ROSENKRANDS, I.; WIDFELDT, M.; BRUCHFELD, J.; GAINES, H. Immune responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA and multiplex technology for diagnosis of M. tuberculosis infection; IP-10 is a promising marker. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e43438, 2012.
- BOUSSIOTIS, V. A.; TSAI, E. Y.; YUNIS, E. J.; THIM, S.; DELGADO, J. C.; DASCHER, C. C.; BEREZOVSKEYA, A.; ROUSSET, D.; REYNES, J. M.; GOLDFELD, A. E. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **J Clin Invest**, v. 105, n. 9, p. 1317-1325, 2000.
- BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 91-97, 2003.
- CALMETTE, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. **Proc R Soc Med**, v. 24, n. 11, p. 1481-1490, 1931.
- CARDONA, P. J. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. **Infection**, v. 37, n. 2, p. 80-86, 2009.
- CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.; MCDERMOTT, P. F.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. IS6110: conservation of sequence in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprinting. **Mol Cell Probes**, v. 5, n. 1, p. 73-80, 1991.
- CHATTERJEE, D.; BOZIC, C. M.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P. J. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. **J Biol Chem**, v. 266, n. 15, p. 9652-9660, 1991.
- CHEN, X.; ZHANG, M.; LIAO, M.; GRANER, M. W.; WU, C.; YANG, Q.; LIU, H.; ZHOU, B. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T Cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, n. 7, p. 734-742, 2010.
- CIRIC, B.; EL-BEHI, M.; CABRERA, R.; ZHANG, G. X.; ROSTAMI, A. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. **J Immunol**, v. 182, n. 9, p. 5296-5305, 2009.
- COLDITZ, G. A.; BREWER, T. F.; BERKEY, C. S.; WILSON, M. E.; BURDICK, E.; FINEBERG, H. V.; MOSTELLER, F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of

tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. **JAMA**, v. 271, n. 9, p. 698-702, 1994.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E., 3RD; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, v. 103, n. 1, p. 1-9, 2001.

CONDE, M. B.; MELO, F. A.; MARQUES, A. M.; CARDOSO, N. C.; PINHEIRO, V. G.; DALCIN PDE, T.; MACHADO JUNIOR, A.; LEMOS, A. C.; NETTO, A. R.; DUROVNI, B.; SANT'ANNA, C. C.; LIMA, D.; CAPONE, D.; BARREIRA, D.; MATOS, E. D.; MELLO, F. C.; DAVID, F. C.; MARSICO, G.; AFIUNE, J. B.; SILVA, J. R.; JAMAL, L. F.; TELLES, M. A.; HIRATA, M. H.; DALCOLMO, M. P.; RABAHI, M. F.; CAILLEAUX-CESAR, M.; PALACI, M.; MORRONE, N.; GUERRA, R. L.; DIETZE, R.; MIRANDA, S. S.; CAVALCANTE, S. C.; NOGUEIRA, S. A.; NONATO, T. S.; MARTIRE, T.; GALESI, V. M.; DETTONI VDO, V. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

CONVERSE, S. E.; MOUGOUS, J. D.; LEAVELL, M. D.; LEARY, J. A.; BERTOZZI, C. R.; COX, J. S. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 6121-6126, 2003.

COOPER, A. M.; KHADER, S. A. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. **Immunol Rev**, v. 226, n., p. 191-204, 2008.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n., p. 393-422, 2009.

COSTANTINO, F.; DE CARVALHO BITTENCOURT, M.; RAT, A. C.; LOEUILLE, D.; DINTINGER, H.; BENE, M. C.; FAURE, G.; CHARY-VALCKENAERE, I. Screening for latent tuberculosis infection in patients with chronic inflammatory arthritis: discrepancies between tuberculin skin test and interferon-gamma release assay results. **J Rheumatol**, v. 40, n. 12, p. 1986-1993, 2013.

CRUMP, J. A.; RELLER, L. B. Two decades of disseminated tuberculosis at a university medical center: the expanding role of mycobacterial blood culture. **Clin Infect Dis**, v. 37, n. 8, p. 1037-1043, 2003.

DA COSTA, A. C.; COSTA-JUNIOR ADE, O.; DE OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, S. V.; ROSA, J. D.; RESENDE, D. P.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. A new

recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112848, 2014.

DAFFE, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. **Tuber Lung Dis**, v. 79, n. 3, p. 153-169, 1999.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir Med**, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.

DANNENBERG, A. M., JR. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunol Today**, v. 12, n. 7, p. 228-233, 1991.

DAS, R.; KOO, M. S.; KIM, B. H.; JACOB, S. T.; SUBBIAN, S.; YAO, J.; LENG, L.; LEVY, R.; MURCHISON, C.; BURMAN, W. J.; MOORE, C. C.; SCHELD, W. M.; DAVID, J. R.; KAPLAN, G.; MACMICKING, J. D.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 32, p. E2997-3006, 2013.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 37-49, 2009.

DAY, C. L.; ABRAHAMS, D. A.; LERUMO, L.; JANSE VAN RENSBURG, E.; STONE, L.; O'RIE, T.; PIENAAR, B.; DE KOCK, M.; KAPLAN, G.; MAHOMED, H.; DHEDA, K.; HANEKOM, W. A. Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2222-2232, 2011.

DE ARAUJO-FILHO, J. A.; VASCONCELOS, A. C., JR.; MARTINS DE SOUSA, E.; KIPNIS, A.; RIBEIRO, E.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Cellular responses to MPT-51, GlcB and ESAT-6 among MDR-TB and active tuberculosis patients in Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 88, n. 5, p. 474-481, 2008.

DE JONG, J. W.; VAN ALTENA, R. Non-respiratory tuberculosis with *Mycobacterium tuberculosis* after penetrating lesions of the skin: five case histories. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, n. 12, p. 1184-1187, 2000.

DE KANTOR, I. N. Diagnosis of latent tuberculosis infection in BCG-vaccinated subjects in China. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 11, p. 1560-1561; author reply 1561, 2011.

DE SOUSA, E. M.; DA COSTA, A. C.; TRENTINI, M. M.; DE ARAUJO FILHO, J. A.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Correction: Immunogenicity of a Fusion Protein Containing Immunodominant Epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from in Mice and Active TB Infection. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p., 2013.

DHEDA, K.; VAN ZYL SMIT, R.; BADRI, M.; PAI, M. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. **Curr Opin Pulm Med**, v. 15, n. 3, p. 188-200, 2009.

DJOBA SIAWAYA, J. F.; BEYERS, N.; VAN HELDEN, P.; WALZL, G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. **Clin Exp Immunol**, v. 156, n. 1, p. 69-77, 2009.

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**, v. 18, n. 3, p. 203-207, 1997.

DOHERTY, T. M.; ARDITI, M. TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer? **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1699-1703, 2004.

DORMAN, S. E. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside, and beyond. **Clin Infect Dis**, v. 50 Suppl 3, n., p. S173-177, 2010.

DOZ, E.; LOMBARD, R.; CARRERAS, F.; BUZONI-GATEL, D.; WINTER, N. Mycobacteria-infected dendritic cells attract neutrophils that produce IL-10 and specifically shut down Th17 CD4 T cells through their IL-10 receptor. **J Immunol**, v. 191, n. 7, p. 3818-3826, 2013.

DUTTA, R. K.; KATHANIA, M.; RAJE, M.; MAJUMDAR, S. IL-6 inhibits IFN-gamma induced autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 6, p. 942-954, 2012.

DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M. C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. **JAMA**, v. 282, n. 7, p. 677-686, 1999.

DYE, C.; WATT, C. J.; BLEED, D. M.; HOSSEINI, S. M.; RAVIGLIONE, M. C. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. **JAMA**, v. 293, n. 22, p. 2767-2775, 2005.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 8, p. 581-591, 2012.

EWEN, C. L.; KANE, K. P.; BLEACKLEY, R. C. A quarter century of granzymes. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 28-35, 2012.

FELDMAN, W. H.; BAGGENSTOSS, A. H. The residual infectivity of the primary complex of tuberculosis. **Am J Pathol**, v. 14, n. 4, p. 473-490 473, 1938.

FLESCH, I.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 138, n. 12, p. 4408-4413, 1987.

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

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

FORRELLAD, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRE, A.; SABIO Y GARCIA, J.; MORBIDONI, H. R.; DE LA PAZ SANTANGELO, M.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

FRANKEL, A.; PENROSE, C.; EMER, J. Cutaneous tuberculosis: a practical case report and review for the dermatologist. **J Clin Aesthet Dermatol**, v. 2, n. 10, p. 19-27, 2009.

GARTON, N. J.; WADDELL, S. J.; SHERRATT, A. L.; LEE, S. M.; SMITH, R. J.; SENNER, C.; HINDS, J.; RAJAKUMAR, K.; ADEGBOLA, R. A.; BESRA, G. S.; BUTCHER, P. D.; BARER, M. R. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum. **PLoS Med**, v. 5, n. 4, p. e75, 2008.

GEDDE-DAHL, T. Tuberculous infection in the light of tuberculin matriculation. **Am J Hyg**, v. 56, n. 2, p. 139-214, 1952.

GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K. L.; DRIJFHOUT, J. W.; D'SOUZA, S.; NECKER, A.; HUYGEN, K.; OTTENHOFF, T. H. Identification of major epitopes of Mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. **J Immunol**, v. 165, n. 11, p. 6463-6471, 2000.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 514-532, 2012.

GERSHON, R. K.; KRUGER, J.; NAYSMITH, J. D.; WAKSMAN, B. H. Cellular basis for immunologic memory. **Nature**, v. 232, n. 5313, p. 639-641, 1971.

GIDEON, H. P.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: what the host "sees"? **Immunol Res**, v. 50, n. 2-3, p. 202-212, 2011.

GILLIET, M.; LIU, Y. J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. **J Exp Med**, v. 195, n. 6, p. 695-704, 2002.

GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL: SURVEILLANCE, PLANNING, FINANVING. WHO report 2012. Geneva, Switzerland:WHO; 2012.

GOERDT, S.; POLITZ, O.; SCHLEDZEWSKI, K.; BIRK, R.; GRATCHEV, A.; GUILLOT, P.; HAKIY, N.; KLEMKE, C. D.; DIPPEL, E.; KODELJA, V.; ORFANOS, C. E. Alternative versus classical activation of macrophages. **Pathobiology**, v. 67, n. 5-6, p. 222-226, 1999.

GONZALEZ-MARTIN, J.; GARCIA-GARCIA, J. M.; ANIBARRO, L.; VIDAL, R.; ESTEBAN, J.; BLANQUER, R.; MORENO, S.; RUIZ-MANZANO, J. [Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis]. **Arch Bronconeumol**, v. 46, n. 5, p. 255-274, 2010.

GOPI, P. G.; CHANDRASEKARAN, V.; SUBRAMANI, R.; SANTHA, T.; THOMAS, A.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, P. R. Association of conversion & cure with initial smear grading among new smear positive pulmonary tuberculosis patients treated with Category I regimen. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 6, p. 807-814, 2006.

GRIMBLE, R. F.; TAPPIA, P. S. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. **Z Ernahrungswiss**, v. 37 Suppl 1, n., p. 57-65, 1998.

GUIMARAES, N. A. [Cutaneous tuberculosis; aspects in Brazil]. **Rev Bras Med**, v. 14, n. 2, p. 105-112, 1957.

HARARI, A.; ROZOT, V.; ENDERS, F. B.; PERREAU, M.; STALDER, J. M.; NICOD, L. P.; CAVASSINI, M.; CALANDRA, T.; BLANCHET, C. L.; JATON, K.; FAOUZI, M.; DAY, C. L.; HANEKOM, W. A.; BART, P. A.; PANTALEO, G. Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 372-376, 2011a.

HATHERILL, M.; VERVER, S.; MAHOMED, H. Consensus statement on diagnostic end points for infant tuberculosis vaccine trials. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 4, p. 493-501, 2012.

HERNANDEZ-PANDO, R.; JEYANATHAN, M.; MENGISTU, G.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; HARBOE, M.; ROOK, G. A.; BJUNE, G. Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection. **Lancet**, v. 356, n. 9248, p. 2133-2138, 2000.

HERNANDEZ-PANDO, R.; OROZCO, H.; AGUILAR, D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 57, n. 5, p. 355-367, 2009.

HERZMANN, C.; ERNST, M.; EHLERS, S.; STENGER, S.; MAERTZDORF, J.; SOTGIU, G.; LANGE, C. Increased frequencies of pulmonary regulatory T-cells in latent Mycobacterium tuberculosis infection. **Eur Respir J**, v. 40, n. 6, p. 1450-1457, 2012.

HESSELING, A. C.; WALZL, G.; ENARSON, D. A.; CARROLL, N. M.; DUNCAN, K.; LUKEY, P. T.; LOMBARD, C.; DONALD, P. R.; LAWRENCE, K. A.; GIE, R. P.; VAN HELDEN, P. D.; BEYERS, N. Baseline sputum time to detection predicts month two culture conversion and relapse in non-HIV-infected patients. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 14, n. 5, p. 560-570, 2010.

HIRAOKA, A.; SUGIMURA, A.; SEKI, T.; NAGASAWA, T.; OHTA, N.; SHIMONISHI, M.; HAGIYA, M.; SHIMIZU, S. Cloning, expression, and characterization of a cDNA encoding a novel human growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 14, p. 7577-7582, 1997.

HIRSCH, C. S.; TOOSI, Z.; JOHNSON, J. L.; LUZZE, H.; NTAMBI, L.; PETERS, P.; MCHUGH, M.; OKWERA, A.; JOLOBA, M.; MUGYENYI, P.; MUGERWA, R. D.; TEREBUH, P.; ELLNER, J. J. Augmentation of apoptosis and interferon-gamma

production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 183, n. 5, p. 779-788, 2001.

HMAMA, Z.; GABATHULER, R.; JEFFERIES, W. A.; DE JONG, G.; REINER, N. E. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. **J Immunol**, v. 161, n. 9, p. 4882-4893, 1998.

HORWITZ, M. A.; LEE, B. W.; DILLON, B. J.; HARTH, G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1530-1534, 1995.

HOUGARDY, J. M.; PLACE, S.; HILDEBRAND, M.; DROWART, A.; DEBRIE, A. S.; LOCHT, C.; MASCART, F. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 4, p. 409-416, 2007.

IBANA, J. A.; MYERS, L.; PORRETTA, C.; LEWIS, M.; TAYLOR, S. N.; MARTIN, D. H.; QUAYLE, A. J. The major CD8 T cell effector memory subset in the normal and *Chlamydia trachomatis*-infected human endocervix is low in perforin. **BMC Immunol**, v. 13, n., p. 66, 2012.

IVANYI, J. Function and Potentials of Epitopes. **Front Immunol**, v. 5, n., p. 107, 2014.

JAMES, B. W.; WILLIAMS, A.; MARSH, P. D. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. **J Appl Microbiol**, v. 88, n. 4, p. 669-677, 2000.

JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; DE OLIVEIRA, F. M.; TRENTINI, M. M.; TIWARI, S.; CHEN, B.; RESENDE, D. P.; SILVA, B. D.; CHEN, M.; TESFA, L.; JACOBS, W. R., JR.; KIPNIS, A. Prime-boost with *Mycobacterium smegmatis* recombinant vaccine improves protection in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78639, 2013.

JURADO, J. O.; PASQUINELLI, V.; ALVAREZ, I. B.; PENA, D.; ROVETTA, A. I.; TATEOSIAN, N. L.; ROMEO, H. E.; MUSELLA, R. M.; PALMERO, D.; CHULUYAN, H. E.; GARCIA, V. E. IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. **J Leukoc Biol**, v. 91, n. 6, p. 991-1002, 2012.

KASSA, D.; RAN, L.; GEBEREMESKEL, W.; TEBEJE, M.; ALEMU, A.; SELASE, A.; TEGBARU, B.; FRANKEN, K. L.; FRIGGEN, A. H.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; OTTENHOFF, T. H.; WOLDAY, D.; MESSELE, T.; VAN BAARLE, D. Analysis of immune responses against a wide range of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with active pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 12, p. 1907-1915, 2012.

KAUFMANN, S. H.; WINAU, F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1063-1066, 2005.

- KEANE, J.; GERSHON, S.; WISE, R. P.; MIRABILE-LEVENS, E.; KASZNICA, J.; SCHWIETERMAN, W. D.; SIEGEL, J. N.; BRAUN, M. M. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **N Engl J Med**, v. 345, n. 15, p. 1098-1104, 2001.
- KIK, S. V.; DENKINGER, C. M.; CHEDORE, P.; PAI, M. Replacing smear microscopy for the diagnosis of tuberculosis: what is the market potential? **Eur Respir J**, v., n., p., 2014.
- KOHMO, S.; KIJIMA, T.; MORI, M.; MINAMI, T.; NAMBA, Y.; YANO, Y.; YONEDA, T.; TAKEDA, Y.; KITADA, S.; YAMAGUCHI, T.; TACHIBANA, I.; YOKOTA, S. CXCL12 as a biological marker for the diagnosis of tuberculous pleurisy. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 92, n. 3, p. 248-252, 2012.
- KONDO, T.; TAKATA, H.; MATSUKI, F.; TAKIGUCHI, M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 1794-1798, 2009.
- KONOMI, N.; LEBWOHL, E.; MOWBRAY, K.; TATTERSALL, I.; ZHANG, D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4738-4740, 2002.
- KREMER, L.; MAUGHAN, W. N.; WILSON, R. A.; DOVER, L. G.; BESRA, G. S. The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. **Lett Appl Microbiol**, v. 34, n. 4, p. 233-237, 2002.
- KRUH, N. A.; TROUDT, J.; IZZO, A.; PRENNI, J.; DOBOS, K. M. Portrait of a pathogen: the Mycobacterium tuberculosis proteome in vivo. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13938, 2010.
- KUMAR, N. P.; GOPINATH, V.; SRIDHAR, R.; HANNA, L. E.; BANUREKHA, V. V.; JAWAHAR, M. S.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. IL-10 dependent suppression of type 1, type 2 and type 17 cytokines in active pulmonary tuberculosis. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59572, 2013.
- LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, 2011.
- LAZAREVIC, V.; FLYNN, J. CD8+ T cells in tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 8, p. 1116-1121, 2002.
- LEISTIKOW, R. L.; MORTON, R. A.; BARTEK, I. L.; FRIMPONG, I.; WAGNER, K.; VOSKUIL, M. I. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. **J Bacteriol**, v. 192, n. 6, p. 1662-1670, 2010.
- LESLEY, R.; RAMAKRISHNAN, L. Insights into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 277-283, 2008.
- LEUNG, A. N. Pulmonary tuberculosis: the essentials. **Radiology**, v. 210, n. 2, p. 307-322, 1999.

LI, X.; ZHOU, Q.; YANG, W. B.; XIONG, X. Z.; DU, R. H.; ZHANG, J. C. Pleural mesothelial cells promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in tuberculous pleural effusion. **J Clin Immunol**, v. 33, n. 4, p. 775-787, 2013.

LIMA, V. M.; BONATO, V. L.; LIMA, K. M.; DOS SANTOS, S. A.; DOS SANTOS, R. R.; GONCALVES, E. D.; FACCIOLI, L. H.; BRANDAO, I. T.; RODRIGUES-JUNIOR, J. M.; SILVA, C. L. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5305-5312, 2001.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. **J Immunol**, v. 185, n. 1, p. 15-22, 2010.

LIU, C.; ZHAN, X.; XIAO, Z.; FAN, Q.; DENG, L.; CUI, M.; XIONG, C.; XUE, J.; XIE, X. Transcript levels of major interleukins in relation to the clinicopathological profile of patients with tuberculous intervertebral discs and healthy controls. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e101324, 2014.

LIU, Y.; LAN, Q.; LU, L.; CHEN, M.; XIA, Z.; MA, J.; WANG, J.; FAN, H.; SHEN, Y.; RYFFEL, B.; BRAND, D.; QUISMORIO, F.; LIU, Z.; HORWITZ, D. A.; XU, A.; ZHENG, S. G. Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> regulatory T cells. **J Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 81-92, 2014.

LJUBENOVIC, M. S.; LJUBENOVIC, D. B.; BINIC, II; JANKOVIC, A. S.; JANCIC, S. A. Cutaneous tuberculosis and squamous-cell carcinoma. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 541-544, 2011.

MAARTENS, G.; WILKINSON, R. J. Tuberculosis. **Lancet**, v. 370, n. 9604, p. 2030-2043, 2007.

MADUSKAR, P.; MUYOYETA, M.; AYLES, H.; HOGEWEG, L.; PETERS-BAX, L.; VAN GINNEKEN, B. Detection of tuberculosis using digital chest radiography: automated reading vs. interpretation by clinical officers. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 17, n. 12, p. 1613-1620, 2013.

MARQUES, C. D.; DUARTE, A. L.; DE LORENA, V. M.; SOUZA, J. R.; SOUZA, W. V.; GOMES YDE, M.; DE CARVALHO, E. M. Evaluation of an interferon gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 30, n. 1, p. 57-62, 2009.

MAZZACCARO, R. J.; STENGER, S.; ROCK, K. L.; PORCELLI, S. A.; BRENNER, M. B.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Cytotoxic T lymphocytes in resistance to tuberculosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 452, n., p. 85-101, 1998.

MCGEACHY, M. J.; BAK-JENSEN, K. S.; CHEN, Y.; TATO, C. M.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D. J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol**, v. 8, n. 12, p. 1390-1397, 2007.

MELO CARDOSO ALMEIDA, C.; VASCONCELOS, A. C., JR.; KIPNIS, A.; ANDRADE, A. L.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Humoral immune responses of tuberculosis patients in Brazil indicate recognition of Mycobacterium tuberculosis MPT-51 and GlcB. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 3, p. 579-581, 2008.

MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 159, n. 1, p. 15-21, 1999.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Esquema de tratamento para tuberculose sofre mudanças; 2011.

MOHAGHEGHPOUR, N.; GAMMON, D.; KAWAMURA, L. M.; VAN VOLLENHOVEN, A.; BENIKE, C. J.; ENGLEMAN, E. G. CTL response to Mycobacterium tuberculosis: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. **J Immunol**, v. 161, n. 5, p. 2400-2406, 1998.

MONTAMAT-SICOTTE, D. J.; MILLINGTON, K. A.; WILLCOX, C. R.; HINGLEY-WILSON, S.; HACKFORTH, S.; INNES, J.; KON, O. M.; LAMMAS, D. A.; MINNIKIN, D. E.; BESRA, G. S.; WILLCOX, B. E.; LALVANI, A. A mycolic acid-specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2493-2503, 2011.

NAGAI, S.; WIKER, H. G.; HARBOE, M.; KINOMOTO, M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v. 59, n. 1, p. 372-382, 1991.

NAM, J. S.; TERABE, M.; KANG, M. J.; CHAE, H.; VOONG, N.; YANG, Y. A.; LAURENCE, A.; MICHALOWSKA, A.; MAMURA, M.; LONNING, S.; BERZOFSKY, J. A.; WAKEFIELD, L. M. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. **Cancer Res**, v. 68, n. 10, p. 3915-3923, 2008.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA MDA, G.; LAPA E SILVA, J. R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J. R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J. L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J Exp Med**, v. 183, n. 5, p. 2293-2302, 1996.

NIEMEYER-CORBELLINI, J. P.; SPINATTO, D.; BOECHAT, N.; CARVALHO, A. C.; PINEIRO-MACEIRA, J.; AZULAY, D. R. Papulonecrotic tuberculid on the scalp. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 10, p. 1028-1032, 2008.

OHNO, H.; ZHU, G.; MOHAN, V. P.; CHU, D.; KOHNO, S.; JACOBS, W. R., JR.; CHAN, J. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in Mycobacterium tuberculosis. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 9, p. 637-648, 2003.

OPIE, E. L. Pathology of the Tuberculosis of Childhood and Its Bearing on Clinical Work. **Br Med J**, v. 2, n. 3493, p. 1130-1135, 1927.

ORME, I. M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 94, n. 1, p. 8-14, 2014.

OTTENHOFF, T. H. The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 16, n. 11, p. 1424-1432, 2012.

ORJUELA, D.; PUERTO, G.; MEJIA, G.; CASTRO, C.; GARZON, M. C.; GARCIA, L. M.; HERNANDEZ, E.; RIBON, W.; RODRIGUEZ, G. Cutaneous tuberculosis after mesotherapy: report of six cases. **Biomedica**, v. 30, n. 3, p. 321-326, 2010.

PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. **Ann Intern Med**, v. 149, n. 3, p. 177-184, 2008.

PARIDA, S. K. True facets of TB diagnosis in 2012: Hypes and realities. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 2, n. 4, p. 275-281, 2012.

PARK, H. D.; GUINN, K. M.; HARRELL, M. I.; LIAO, R.; VOSKUIL, M. I.; TOMPA, M.; SCHOOLNIK, G. K.; SHERMAN, D. R. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 833-843, 2003.

PARK, J. S.; TAMAYO, M. H.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; ORME, I. M.; ORDWAY, D. J. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 1, p. 80-86, 2006.

PENG, Y.; HAN, G.; SHAO, H.; WANG, Y.; KAPLAN, H. J.; SUN, D. Characterization of IL-17+ interphotoreceptor retinoid-binding protein-specific T cells in experimental autoimmune uveitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 9, p. 4153-4161, 2007.

PEREIRA, M. B.; GOMES, M. K.; PEREIRA, F. Tuberculosis verrucosa cutis associated with tuberculous lymphadenitis. **Int J Dermatol**, v. 39, n. 11, p. 856-858, 2000.

PERESI, E.; OLIVEIRA, L. R.; DA SILVA, W. L.; DA COSTA, E. A.; ARAUJO, J. P., JR.; AYRES, J. A.; FORTES, M. R.; GRAVISS, E. A.; PEREIRA, A. C.; CALVI, S. A. Cytokine Polymorphisms, Their Influence and Levels in Brazilian Patients with Pulmonary Tuberculosis during Antituberculosis Treatment. **Tuberc Res Treat**, v. 2013, n., p. 285094, 2013.

PINHEIRO, M. B.; ANTONELLI, L. R.; SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; SPINDOLA-DE-MIRANDA, S.; GUIMARAES, T. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; TOLEDO, V. P. CD4-CD8-alpha-beta and gamma-delta T cells display inflammatory and regulatory potentials during human tuberculosis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50923, 2012.

- PODINOVSKAIA, M.; LEE, W.; CALDWELL, S.; RUSSELL, D. G. Infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces global modifications to phagosomal function. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 6, p. 843-859, 2013.
- POLLOCK, K. M.; WHITWORTH, H. S.; MONTAMAT-SICOTTE, D. J.; GRASS, L.; COOKE, G. S.; KAPEMBWA, M. S.; KON, O. M.; SAMPSON, R. D.; TAYLOR, G. P.; LALVANI, A. T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 208, n. 6, p. 952-968, 2013.
- QIN, X. J.; SHI, H. Z.; HUANG, Z. X.; KANG, L. F.; MO, W. N.; WU, C. Interleukin-16 in tuberculous and malignant pleural effusions. **Eur Respir J**, v. 25, n. 4, p. 605-611, 2005.
- QUESNIAUX, V. J.; NICOLLE, D. M.; TORRES, D.; KREMER, L.; GUERARDEL, Y.; NIGOU, J.; PUZO, G.; ERARD, F.; RYFFEL, B. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4425-4434, 2004.
- RABAHI, M. F.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; DOS REIS, M. C.; OELEMANN, W.; CONDE, M. B. Humoral response to HspX and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Infect Dis**, v. 7, n., p. 148, 2007.
- RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian J Med Res**, v. 120, n. 4, p. 213-232, 2004.
- RAJAN, J.; MATHAI, A. T.; PRASAD, P. V.; KAVIARASAN, P. K. Multifocal tuberculosis verrucosa cutis. **Indian J Dermatol**, v. 56, n. 3, p. 332-334, 2011.
- RALPH, A. P.; ARDIAN, M.; WIGUNA, A.; MAGUIRE, G. P.; BECKER, N. G.; DROGUMULLER, G.; WILKS, M. J.; WARAMORI, G.; TJITRA, E.; SANDJAJA; KENAGALEM, E.; PONTORORING, G. J.; ANSTEY, N. M.; KELLY, P. M. A simple, valid, numerical score for grading chest x-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. **Thorax**, v. 65, n. 10, p. 863-869, 2010.
- RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 352-366, 2012.
- RAMBUKKANA, A.; DAS, P. K.; KOLK, A. H.; BURGGRAAF, J. D.; KUIJPER, S.; HARBOE, M. Identification of a novel 27-kDa protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture fluid by a monoclonal antibody specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Scand J Immunol**, v. 37, n. 4, p. 471-478, 1993.
- REDENTE, E. F.; HIGGINS, D. M.; DWYER-NIELD, L. D.; ORME, I. M.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; MALKINSON, A. M. Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 1, p. 159-168, 2010.

- REIS, M. C.; RABAHI, M. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Health care workers humoral immune response against GLcB, MPT51 and HSPX from *Mycobacterium tuberculosis*. **Braz J Infect Dis**, v. 13, n. 6, p. 417-421, 2009.
- REIS, M. C.; SILVA, B. D.; SOUSA, E. M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Role of antibodies reactive to HspX in discriminating pulmonary tuberculosis contacts with high risk of developing active disease. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 6, p. 617-618, 2011.
- RIBEIRO-RODRIGUES, R.; RESENDE CO, T.; ROJAS, R.; TOOSI, Z.; DIETZE, R.; BOOM, W. H.; MACIEL, E.; HIRSCH, C. S. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol**, v. 144, n. 1, p. 25-34, 2006.
- RIEDEL, D. D.; KAUFMANN, S. H. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4620-4623, 1997.
- RISHI, S.; SINHA, P.; MALHOTRA, B.; PAL, N. A comparative study for the detection of *Mycobacteria* by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination. **Indian J Med Microbiol**, v. 25, n. 4, p. 383-386, 2007.
- ROBERTS, T.; BEYERS, N.; AGUIRRE, A.; WALZL, G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta , and interleukin-4 mRNA levels. **J Infect Dis**, v. 195, n. 6, p. 870-878, 2007.
- ROBERTSON, H. E. The Persistence of Tuberculous Infections. **Am J Pathol**, v. 9, n. Suppl, p. 711-718 711, 1933.
- ROBINSON, C. M.; JUNG, J. Y.; NAU, G. J. Interferon-gamma, tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. **Cytokine**, v. 60, n. 1, p. 233-241, 2012.
- ROZOT, V.; VIGANO, S.; MAZZA-STALDER, J.; IDRIZI, E.; DAY, C. L.; PERREAU, M.; LAZOR-BLANCHET, C.; PETRUCCIOLI, E.; HANEKOM, W.; GOLETTI, D.; BART, P. A.; NICOD, L.; PANTALEO, G.; HARARI, A. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 6, p. 1568-1577, 2013.
- RUIZ-MANZANO, J.; BLANQUER, R.; CALPE, J. L.; CAMINERO, J. A.; CAYLA, J.; DOMINGUEZ, J. A.; GARCIA, J. M.; VIDAL, R. [Diagnosis and treatment of tuberculosis]. **Arch Bronconeumol**, v. 44, n. 10, p. 551-566, 2008.
- SARANTOPOULOS, S.; LU, L.; CANTOR, H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. **J Clin Invest**, v. 114, n. 9, p. 1218-1221, 2004.
- SAUNDERS, B. M.; COOPER, A. M. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. **Immunol Cell Biol**, v. 78, n. 4, p. 334-341, 2000.

SCHERTZER, J. D.; STEINBERG, G. R. Immunometabolism: the interface of immune and metabolic responses in disease. **Immunol Cell Biol**, v. 92, n. 4, p. 303, 2014.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim da Tuberculose no Brasil; 2013.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Implantação do novo teste de diagnóstico para tuberculose; 2014.

SCRIBA, T. J.; KALSDORF, B.; ABRAHAMS, D. A.; ISAACS, F.; HOFMEISTER, J.; BLACK, G.; HASSAN, H. Y.; WILKINSON, R. J.; WALZL, G.; GELDERBLOEM, S. J.; MAHOMED, H.; HUSSEY, G. D.; HANEKOM, W. A. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. **J Immunol**, v. 180, n. 3, p. 1962-1970, 2008.

SEHGAL, V. N.; WAGH, S. A.; BHATTACHARYA, S. N.; SHARMA, V. K. Peripheral T lymphocytes and their subsets in cutaneous tuberculosis. **Int J Dermatol**, v. 31, n. 2, p. 110-112, 1992.

SELVARAJ, P.; ALAGARASU, K.; SINGH, B. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of south India. **Int J Immunogenet**, v. 39, n. 1, p. 26-31, 2012.

SHAO, L.; ZHANG, W.; ZHANG, S.; CHEN, C. Y.; JIANG, W.; XU, Y.; MENG, C.; WENG, X.; CHEN, Z. W. Potent immune responses of Ag-specific Vgamma2Vdelta2+ T cells and CD8+ T cells associated with latent stage of Mycobacterium tuberculosis coinfection in HIV-1-infected humans. **AIDS**, v. 22, n. 17, p. 2241-2250, 2008.

SHIMAO, T. [Pulmonary tuberculosis]. **Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi**, v. Suppl, n., p. 97-101, 2003.

SHIMAO, T. [Tuberculosis and its control--lessons from the past and future prospect]. **Kekkaku**, v. 80, n. 6, p. 481-489, 2005.

SIBLEY, L. D.; HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J.; KRAHENBUHL, J. L. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. **Infect Immun**, v. 56, n. 5, p. 1232-1236, 1988.

SILVA, B. D.; DA SILVA, E. B.; DO NASCIMENTO, I. P.; DOS REIS, M. C.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4402-4407, 2009.

SILVA, B. D.S.; ALVES, S.A.L.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Late diagnosis and TCD8 immune response profile of cutaneous tuberculosis: a case report. **Open J. Immunol**, v. 2, p. 125-131, 2012.

SILVA, B. D.; TRENTINI, M. M.; DA COSTA, A. C.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. **Immunol Lett**, v. 160, n. 1, p. 23-32, 2014a.

SILVA, B. D.; TANNUS-SILVA, D. G.; RABAHI, M. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. The use of Mycobacterium tuberculosis HspX and GlcB proteins to identify latent tuberculosis in rheumatoid arthritis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 29-37, 2014b.

SINGH, M.; MYNAK, M. L.; KUMAR, L.; MATHEW, J. L.; JINDAL, S. K. Prevalence and risk factors for transmission of infection among children in household contact with adults having pulmonary tuberculosis. **Arch Dis Child**, v. 90, n. 6, p. 624-628, 2005.

SINGH, S.; SARAAY, I.; SHARMA, S. Immunogenic potential of latency associated antigens against Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine**, v. 32, n. 6, p. 712-716, 2014.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.

SORENSEN, R. B.; HADRUP, S. R.; SVANE, I. M.; HJORTSO, M. C.; THOR STRATEN, P.; ANDERSEN, M. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. **Blood**, v. 117, n. 7, p. 2200-2210, 2011.

STEINGART, K. R.; NG, V.; HENRY, M.; HOPEWELL, P. C.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M. D.; AZIZ, M. A.; PAI, M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 10, p. 664-674, 2006.

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**, v. 276, n. 5319, p. 1684-1687, 1997.

STENGER, S.; NIAZI, K. R.; MODLIN, R. L. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 161, n. 7, p. 3582-3588, 1998.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. **Immunol Rev**, v. 205, n., p. 60-71, 2005.

SUTHERLAND, J. S.; DE JONG, B. C.; JEFFRIES, D. J.; ADETIFA, I. M.; OTA, M. O. Production of TNF-alpha, IL-12(p40) and IL-17 can discriminate between active TB disease and latent infection in a West African cohort. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12365, 2010.

TAJIMA, M.; WAKITA, D.; NOGUCHI, D.; CHAMOTO, K.; YUE, Z.; FUGO, K.; ISHIGAME, H.; IWAKURA, Y.; KITAMURA, H.; NISHIMURA, T. IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells. **J Exp Med**, v. 205, n. 5, p. 1019-1027, 2008.

TALAAAT, A. M.; WARD, S. K.; WU, C. W.; RONDON, E.; TAVANO, C.; BANNANTINE, J. P.; LYONS, R.; JOHNSTON, S. A. Mycobacterial bacilli are

metabolically active during chronic tuberculosis in murine lungs: insights from genome-wide transcriptional profiling. **J Bacteriol**, v. 189, n. 11, p. 4265-4274, 2007.

TANNUS SILVA, D. G.; SILVA, B. D.; TORRES, P. P.; SANTANA, P. J., JR.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; FOUAD RABAHI, M. Latent tuberculosis in rheumatoid arthritis: evaluating cellular response and high-resolution computed tomography. **Arch Bronconeumol**, v. 48, n. 5, p. 144-149, 2012.

TIWARI, S.; KISHAN, K. V.; CHAKRABARTI, T.; CHAKRABORTI, P. K. Amino acid residues involved in autophosphorylation and phosphotransfer activities are distinct in nucleoside diphosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 42, p. 43595-43603, 2004.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 455-462, 2010.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. What do we really know about how CD4 T cells control *Mycobacterium tuberculosis*? **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. e1002196, 2011.

TRUNZ, B. B.; FINE, P.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. **Lancet**, v. 367, n. 9517, p. 1173-1180, 2006.

TZARTOS, J. S.; FRIESE, M. A.; CRANER, M. J.; PALACE, J.; NEWCOMBE, J.; ESIRI, M. M.; FUGGER, L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am J Pathol**, v. 172, n. 1, p. 146-155, 2008.

ULRICHS, T.; KOSMIADI, G. A.; TRUSOV, V.; JORG, S.; PRADL, L.; TITUKHINA, M.; MISHENKO, V.; GUSHINA, N.; KAUFMANN, S. H. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. **J Pathol**, v. 204, n. 2, p. 217-228, 2004.

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **J Pathol**, v. 208, n. 2, p. 261-269, 2006.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 294-309, 2002.

WANG, C.; PEYRON, P.; MESTRE, O.; KAPLAN, G.; VAN SOOLINGEN, D.; GAO, Q.; GICQUEL, B.; NEYROLLES, O. Innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and other genotypes. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13594, 2010.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **J Comp Pathol**, v. 133, n. 4, p. 223-234, 2005.

WAYNE, L. G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 11, p. 908-914, 1994.

WEI, G.; WEI, L.; ZHU, J.; ZANG, C.; HU-LI, J.; YAO, Z.; CUI, K.; KANNO, Y.; ROH, T. Y.; WATFORD, W. T.; SCHONES, D. E.; PENG, W.; SUN, H. W.; PAUL, W. E.; O'SHEA, J. J.; ZHAO, K. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 155-167, 2009.

WHEELER, P. R.; RATLEDGE, C. Metabolism in *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis* and other pathogenic mycobacteria. **Br Med Bull**, v. 44, n. 3, p. 547-561, 1988.

WIKER, H. G.; HARBOE, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiol Rev**, v. 56, n. 4, p. 648-661, 1992.

WILSON, R. A.; MAUGHAN, W. N.; KREMER, L.; BESRA, G. S.; FUTTERER, K. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. **J Mol Biol**, v. 335, n. 2, p. 519-530, 2004.

WOLFE, L. M.; MAHAFFEY, S. B.; KRUIH, N. A.; DOBOS, K. M. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Proteome Res**, v. 9, n. 11, p. 5816-5826, 2010.

WOLFE, L. M.; VEERARAGHAVAN, U.; IDICULA-THOMAS, S.; SCHURER, S.; WENNERBERG, K.; REYNOLDS, R.; BESRA, G. S.; DOBOS, K. M. A chemical proteomics approach to profiling the ATP-binding proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 6, p. 1644-1660, 2013.

WOODWORTH, J. S.; WU, Y.; BEHAR, S. M. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8595-8603, 2008.

WOODWORTH, J. S.; SHIN, D.; VOLMAN, M.; NUNES-ALVES, C.; FORTUNE, S. M.; BEHAR, S. M. *Mycobacterium tuberculosis* directs immunofocusing of CD8+ T cell responses despite vaccination. **J Immunol**, v. 186, n. 3, p. 1627-1637, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual of the national tuberculosis and leprosy programme; 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual of the national tuberculosis and leprosy programme; 2013.

WU, B.; HUANG, C.; KATO-MAEDA, M.; HOPEWELL, P. C.; DALEY, C. L.; KRENSKY, A. M.; CLAYBERGER, C. Messenger RNA expression of IL-8, FOXP3, and IL-12beta differentiates latent tuberculosis infection from disease. **J Immunol**, v. 178, n. 6, p. 3688-3694, 2007.

WU, Y. E.; ZHANG, S. W.; PENG, W. G.; LI, K. S.; LI, K.; JIANG, J. K.; LIN, J. H.; CAI, Y. M. Changes in lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. **J Int Med Res**, v. 37, n. 6, p. 1742-1749, 2009.

XYSTRAKIS, E.; DEJEAN, A. S.; BERNARD, I.; DRUET, P.; LIBLAU, R.; GONZALEZ-DUNIA, D.; SAOUDI, A. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3294-3301, 2004.

YOUNG, D. B.; GIDEON, H. P.; WILKINSON, R. J. Eliminating latent tuberculosis. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 5, p. 183-188, 2009.

ZEKA, A. N.; TASBAKAN, S.; CAVUSOGLU, C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 12, p. 4138-4141, 2011.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 646-655, 2009.

ZINK, A. R.; REISCHL, U.; WOLF, H.; NERLICH, A. G. Molecular analysis of ancient microbial infections. **FEMS Microbiol Lett**, v. 213, n. 2, p. 141-147, 2002.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética dos pacientes com tuberculose e controles sadios



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL



PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 055/2009

Goiânia, 29/05/2009

**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL:** Prof.ª Dr.ª Ana Paula Junqueira Kipnis

**Pesquisadores Participantes:** André Kipnis, Arioldo Carvalho Vasconcelos Júnior, João Alves de Araújo Filho, Bruna Daniella de Souza Silva, Francielle Poliana de Medeiros Rocha Guimarães e Suzana de Paiva Diniz.

**TÍTULO:** “Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa”.

**Área Temática:** Grupo III

**Local de realização:** IPATSP/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, analisou e aprovou o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

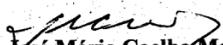
Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)

**Para sua ciência, citamos:**

*Item 7 (página 27) do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa, que diz: “A pós graduação pressupõe a existência de responsabilidade profissional, o desenvolvimento de competências nas áreas científica e metodológica e o conhecimento das normas de proteção aos sujeitos de pesquisa, por parte do pesquisador. Assim sendo, o pós graduando tem qualificação para assumir o papel de pesquisador responsável. Por outro lado, a participação de alunos de graduação em pesquisas pressupõe a orientação de um professor responsável pelas atividades do graduando e, portanto, o professor orientador deve figurar como pesquisador responsável*

  
Farm. José Mário Coelho Moraes  
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 3269 8338 - FAX: 3269 8426  
GOIÂNIA - GOIÁS

## **Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes com tuberculose e controles sadios**

**Título do projeto: Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.**

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, Imunologista. Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325 – IPTSP/UFG. Telefone: (62) 3209-6174.

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), na pesquisa indicada acima que será realizada na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-GO). Após ler com atenção e ser esclarecido (a) sobre suas dúvidas, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Esta pesquisa tem como objetivo identificar e caracterizar células que são importantes na defesa contra *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença Tuberculose). O resultado deste projeto tentará melhorar a metodologia de diagnóstico e tratamento desta doença. Os nomes dos pesquisadores envolvidos são: Bruna Daniella de Souza Silva (Doutoranda), Adeliane Castro da Costa (Mestranda), Abadio Oliveira Costa Júnior (Biomédico), Monalisa Martins Trentini (Técnica do laboratório) e o pesquisador responsável Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com qualquer um de nós através do telefone (62) 3209 – 6174.

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: (62) 3269 – 83 38 / (62) 3269 – 84 26.

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para explicar-lhe o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. Serão coletados 20mL do seu sangue para obtenção de soro e das células. Para coletar o seu sangue, o seu braço será esterilizado (limpado) com álcool, e depois de garrotear (amarrar um elástico) a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringa estéril. Um banco de soros e células dos pacientes com tuberculose será formado para utilizar em estudos posteriores que auxiliem no diagnóstico da tuberculose.

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Em qualquer momento da pesquisa você poderá desistir de participar sem nenhum prejuízo no tratamento e no acompanhamento médico.

Os dados obtidos, assim como o seu estado de saúde e os resultados dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pelo pesquisador responsável.

Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica internacional e não serão armazenados para estudos futuros.

Este estudo tem duração prevista de Julho de 2009 a Março de 2013. Você terá como benefício desta participação o seu hemograma e a contagem/porcentagem de células (linfócitos) no sangue. Os resultados serão enviados diretamente ao seu médico e você poderá obtê-los na sua próxima consulta. Não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Porém em caso de danos decorrentes de sua participação na pesquisa, você terá direito a pleitear indenização junto à Instituição Financiadora – CNPq.

### Consentimento da participação

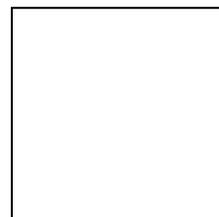
Eu, \_\_\_\_\_,  
RG/CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, sob a responsabilidade da Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento médico.

Nome do participante (letra de forma): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local e Data: \_\_\_\_\_

Assinatura Dactiloscópica:



Testemunhas com RG.

1.Nome/assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

2.Nome/assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

### Anexo 3 - Questionário dos pacientes com tuberculose e controles sadios

**Questionário do projeto:** Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Número do prontuário: \_\_\_\_\_

1. Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Raça: [ ] Branca [ ] Negra [ ] Amarela [ ] Parda [ ] Indígena [ ] Ignorada

Sexo: [ ] Masculino [ ] Feminino

Estado civil: \_\_\_\_\_ Grau de instrução: \_\_\_\_\_

End.Residencial: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_ Contato: \_\_\_\_\_

Ponto de referência:

\_\_\_\_\_

Há quanto tempo mora nesta residência: [ ] 3-6 meses [ ] 7-12 meses [ ] >1 ano

\_\_\_\_\_

End.anterior: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Cidade de origem:

\_\_\_\_\_

Quanto tempo mora em Goiânia:

\_\_\_\_\_

Número de indivíduos na residência: \_\_\_\_\_

2. End.Trabalho: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_

Quanto tempo neste trabalho: \_\_\_\_\_

Ocupação / Ramo de atividade econômica: \_\_\_\_\_

3. Foi vacinado (a) com BCG: [ ] sim [ ] não [ ] não sabe

Tem cicatriz vacinal: [ ] sim [ ] não

Diagnóstico clínico: \_\_\_\_\_

Local do diagnóstico: \_\_\_\_\_

Médico responsável: \_\_\_\_\_

Data de diagnóstico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**4. Exames:**

- Raios-X do tórax:  Suspeito  Normal  Não realizado.  
- PPD: \_\_\_\_\_ mm.  
- Baciloscopia de Escarro:  Positiva  Negativa  Não Realizada  
- Cultura:  Positiva  Em Andamento  Negativa  Não Realizada.  
- HIV:  Positivo  Em Andamento  Negativo  Não Realizado

**5. Contatos:**

Teve contato com TB ativa:  sim  não  não sabe

Possui parentes com tuberculose que moram ou moraram na mesma casa:

sim  não  não sabe

Convive ou já conviveu com amigos, vizinhos, namorados (as) portadores de tuberculose:

sim  não  não sabe

Teve contato com hanseníase:  sim  não  não sabe

TB ativa no momento:  sim  não  não sabe

Sinais e sintomas:  Tosse  Escarro  Hemoptise  Emagrecimento  Anorexia  
 Sudorese noturna  Febre

Outros: \_\_\_\_\_

**6. Doenças associadas:**

Diabetes  Doença Renal  Doença Cardíaca  Pressão Alta  Hepatite  HIV  
Outra \_\_\_\_\_

**7. Faz uso de medicamentos:**  Sim  não

Qual? \_\_\_\_\_

É alérgico (a):  Sim  não  não sabe

A que? \_\_\_\_\_

**8. Tratamento anti TB:**

INH:  sim  não  não sabe  
RIF:  sim  não  não sabe  
ETH:  sim  não  não sabe  
PYZ:  sim  não  não sabe  
STP:  sim  não  não sabe

Data de início do tratamento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Esquema: \_\_\_\_\_

**9. Fumante:**  Sim  não

Período? \_\_\_\_\_