

Pâmela Cristina Gaspar

**IMPORTÂNCIA DA CITOMETRIA DE FLUXO NA  
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM  
INDIVÍDUOS PORTADORES DE TUBERCULOSE PULMONAR  
SORONEGATIVOS OU SOROPOSITIVOS AO HIV**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia na área de concentração em Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gaspar, Pâmela Cristina  
Importância da citometria de fluxo na avaliação da  
resposta imune celular em indivíduos portadores de  
tuberculose pulmonar soronegativos ou soropositivos ao HIV  
/ Pâmela Cristina Gaspar ; orientadora, Maria Cláudia  
Santos-Silva ; coorientadora, Maria Luiza Bazzo. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
159 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3.  
Linfócitos. 4. Escarro. 5. Citometria de fluxo. I. Santos-  
Silva, Maria Cláudia. II. Bazzo, Maria Luiza. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia. IV. Título.

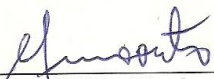
**“Importância da citometria de fluxo na avaliação da resposta imune celular em indivíduos portadores de tuberculose pulmonar soro negativos ou soro positivos ao HIV”**

**POR**

**Pâmela Cristina Gaspar**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

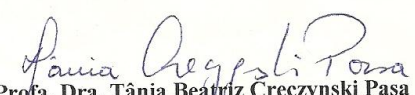
**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edelton Flávio Morato (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Fabíola Branco Filippin Monteiro (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fabrício de Souza Neves (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientadora)

  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2014.





Dedico este trabalho ao meu pai, Mário, e aos meus avós, Alzira, José e Agenor, por sempre caminharem de mãos dadas comigo, onde quer que eu esteja. O amor, o carinho, a amizade e a dedicação de vocês é o combustível para o meu sucesso. Obrigada!



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado, me protegido e me abençoado durante toda esta jornada;

Ao meu pai, Mário, por ser a minha fortaleza, por nunca permitir que eu desanime e por tornar os meus sonhos sempre possíveis;

À minha família, especialmente aos meus avós, Alzira, José e Agenor por todo amor, carinho e palavras de encorajamento imprescindíveis para essa conquista;

À minha mãe Silvana e à minha avó Neuza, exemplos de mulher e de perseverança, por estarem sempre me iluminando lá do céu;

Ao meu inseparável Josh, por ter sido assim, sempre presente, com todo o seu amor canino;

À minha amiga Suely, pelo apoio emocional e pelos momentos de alegria e descontração;

Às minhas amigas da vida, Amanda, Kássia, Elaine, Raquel e Helena, por todo carinho e por estarem sempre comigo, independentemente dos km que o destino nos separar;

Às minhas amigas e irmãs de coração, Kaite e Tatiana, pelo companheirismo, pelo carinho e pelo apoio nos momentos mais difíceis;

Aos meus amigos e amigas da faculdade, pela amizade e pelos momentos de muitas risadas;

Às minhas amigas Manoela, Aninha e Marinlei e aos meus amigos Bernard, Alexandre e Gustavo, por me incentivarem e festejarem com muita alegria todas as minhas conquistas;

Às minhas amigas de LAB Renata, Ana, Letícia, Taiane e Chandra, pelo apoio científico na idealização e/ou execução deste trabalho.

Aos demais companheiros do LOEH e LBMM, por tornarem o meu dia-a-dia sempre muito agradável e cheio de boas risadas, especialmente à Lorena, Daiane, Karina e Vanessa, pela amizade, pelo carinho e por todo apoio prá todas as horas;

À minha amiga e companheira de dissertação Lica, por nunca permitir que eu desanimasse e por tornar a escrita do trabalho um momento muito agradável e divertido.

Aos pacientes, por aceitarem ser voluntários do trabalho, pois, a participação deles foi essencial;

Ao Hospital Nereu Ramos e sua maravilhosa equipe, especialmente às enfermeiras Mônica, Zuleide e Ana, por toda disposição e pela gentil e imprescindível colaboração;



Ao Hospital Universitário da UFSC, por autorizarem a realização do trabalho;

Aos profissionais da Divisão de Análises Clínicas/HU, especialmente aos profissionais dos setores de Hematologia (Ângela, Mari, Vera) e Microbiologia (Luís, Clarisse, Carine, Ivonete, Maria Luíza, Marcos), pelo importante apoio e dedicação;

À Divisão de Vigilância Epidemiológica, especialmente à Nardele, pelo apoio e disposição;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho e ao CAPES, pelo apoio financeiro;

À Maria Cristina Moraes por se dispor a realizar a correção do português;

À professora Rosemeri, pelo apoio científico fundamental para a realização desse trabalho;

Ao professor Marcos, pela colaboração na estatística do trabalho e por todo otimismo;

À farmacêutica-bioquímica Jéssica, pela dedicação e colaboração científica;

À farmacêutica-bioquímica Mara, por todo apoio científico e pelas palavras de encorajamento;

À minha co-orientadora, professora Maria Luíza, por toda orientação científica, pela dedicação ao trabalho, pelo otimismo, pelos conselhos e pela confiança;

À minha orientadora, professora Maria Cláudia, pelo carinho, pelas palavras tranquilizadoras, pelas oportunidades oferecidas e pelos ensinamentos, tanto científicos, como também aqueles pra toda vida.

Por fim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a execução deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

**Muito Obrigada!**

“Essencialmente, todos os modelos estão errados,  
mas alguns são úteis.”

George Edward Pelham Box



## RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) transmitida diretamente de pessoa para pessoa, através da inalação de partículas infectadas pelo MTB. A TB é considerada um problema de saúde pública mundial. A cada ano, são registrados mundialmente, aproximadamente, 9 milhões de novos casos de TB e 1,4 milhões de mortes decorrentes da doença. Indivíduos infectados pelo MTB podem desenvolver tanto uma doença progressiva quanto uma infecção latente, dependendo do seu estado imunológico. Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), caracterizada como uma disfunção grave do sistema imunológico de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), houve um profundo impacto sobre o aumento do número de novos casos de TB. Apesar da forte correlação entre o desenvolvimento da TB e a diminuição de células T CD4+ no sangue periférico de indivíduos coinfectados pelo MTB/HIV estar bem estabelecida, a resposta imune celular pulmonar permanece incerta. Informações relacionadas à citologia do escarro de pacientes com TB são escassas e não se sabe exatamente se há diferenças na resposta imune celular pulmonar entre os pacientes HIV soropositivos e HIV soronegativos. Estas observações reforçam a importância da pesquisa para o desenvolvimento e avaliação de métodos que permitam o estudo das células que envolvem a resposta imune pulmonar no combate à infecção pelo MTB, principalmente nos casos de coinfeção pelo HIV/MTB. A análise das células de escarro por microscopia óptica é um método bem estabelecido para a determinação das subpopulações leucocitárias. No entanto, essa metodologia possui algumas limitações, como a impossibilidade de diferenciação de subtipos celulares morfolologicamente idênticos e a necessidade de uma amostra de boa qualidade. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi a investigação da importância da citometria de fluxo na avaliação da resposta imune celular em indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos soro negativos ou soro positivos ao HIV. Inicialmente, realizou-se a padronização da citometria de fluxo para avaliação dos fenótipos leucocitários do escarro. Após a padronização, avaliou-se a celularidade de 30 amostras de escarro de pacientes portadores de TB pulmonar ativa e bacilíferos. Os resultados demonstraram que os neutrófilos (95,68%) compunham maior percentual do que os monócitos/macrófagos (2,62%) e os linfócitos (1,64%) na celularidade total das amostras de escarro analisadas. Além disso, com relação ao total de linfócitos T (100%),

foram observados em média 12,31% de linfócitos T auxiliares, 24,13% de linfócitos T citotóxicos, 62,85% de linfócitos T gama/delta ( $\gamma\delta$ ) e 0,02% de linfócitos T com fenótipo CD4+ e CD8+. Após a determinação da celularidade, os resultados das amostras de escarro foram subdivididos em dois grupos, soropositivos e soronegativos ao HIV. Na associação desses subgrupos leucocitários acima descritos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas somente para os percentuais de monócitos/macrófagos. Os resultados encontrados mostram que a citometria de fluxo é um método eficaz para avaliar os diferentes subtipos de linfócitos presentes nas amostras de escarro, mesmo daquelas consideradas inviáveis para análise por microscopia óptica. Sendo assim, é de grande importância para o enriquecimento das informações associadas à imunologia da coinfeção pelo MTB/HIV.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, HIV, escarro, leucócitos, citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) that is transmitted directly from person to person through inhalation of infected particles MTB. TB is considered a worldwide public health problem. Each year, an estimated 9 million people developed TB and 1.4 million died from the disease. MTB-infectious individuals may develop either a progressive disease as well as a latent infection, and it is immune-dependent status. With the advent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) that is characterized as a severe dysfunction of the immune system of patients infected with human immunodeficiency virus (HIV), there was a profound impact on increasing number of new TB cases. Despite the strong relationship between the TB development and the decrease of CD4 + cells in peripheral blood of co-infected MTB/HIV individuals be well established, the lung cellular immune response remains unclear. Information regarding the sputum of TB patients is scarce and it is not known exactly if there are cellular differences in lung immune response among HIV-positive and HIV-negative individuals. These observations emphasize the importance of research for development and evaluation techniques to study cells that surround the pulmonary immune response against MTB infection, especially in cases of coinfection HIV/MTB. The analysis of sputum cells by optical microscopy is a well-established method for the determination of leukocyte subpopulations. However, this methodology has some limitations such as the inability to differentiate morphologically identical cell subtypes and the need for a good quality sputum sample. Given the above, the aim of this study was to investigate the importance of flow cytometry to assess the cellular immune response in individuals with active pulmonary TB and bacillary, in HIV-negative or HIV-positive. First, the standardization of flow cytometry was done for assessment of leukocyte phenotypes sputum. After standardization, there were evaluated the cellularity of 30 sputum samples from patients with active pulmonary TB. The results demonstrated that neutrophils (95.68%) comprised the greatest percentage of sputum cellularity cells comparing to monocytes/macrophages (2.62%) and lymphocytes (1.64%) populations in the analyzed samples. Besides that, regarding to total T-lymphocytes (100%) there were observed on average of 12.31% of T helper, 24.13% of T cytotoxic, 62.85% of T gamma/delta ( $\gamma\delta$ ) and 0.02% of T with the phenotype CD4+ and CD8+. After the sputum cellularity determination, the results of the sputum samples were subdivided into two groups,

HIV-positive and HIV-negative. In the association of these leukocyte subsets described above, only statistically significant differences were observed for the percentage of monocytes/ macrophages. The results show that flow cytometry is a powerful method to evaluate the different subtypes of lymphocytes present in sputum samples, even those considered unviable for analysis by light microscopy. Therefore, flow cytometry is of great importance to enrich the informations about the co infection MTB/HIV immunology.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, HIV, sputum, leukocytes, flow cytometry.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Casos em que realização de cultura é indicada .....38

Quadro 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação da espécie por PCR seguida de análise de restrição – PRA-*hsp65*.....73





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação e composição do granuloma .....	44
Figura 2 - Imagem representativa do crescimento bacilar em cultura ..	62
Figura 3 – Representação da estratégia de <i>gate</i> utilizada na análise dos resultados da citometria de fluxo .....	69
Figura 4 – <i>Dot plots</i> representativos da imunofenotipagem de leucócitos em amostras de escarro .....	83
Figura 5 - Representação gráfica de <i>Passing-Bablok</i> .....	86
Figura 6 - Gráfico de Bland-Altman: comparação entre as porcentagens de neutrófilos obtidos pela metodologia de microscopia óptica e de citometria de fluxo .....	87
Figura 7 - Gráfico de Bland-Altman: comparação entre as porcentagens de monócitos/macrófagos obtidos pela metodologia de microscopia óptica e de citometria de fluxo.....	88
Figura 8 - Gráfico de Bland-Altman: comparação entre as porcentagens de linfócitos obtidos pela metodologia de microscopia óptica e de citometria de fluxo .....	89
Figura 9 - Distribuição dos agravos tabagismo, etilismo e uso de drogas ilícitas associadas à tuberculose pulmonar ativa na população estudada .....	94
Figura 10 - Gel representativo da identificação da espécie de micobactéria com a utilização do método PRA- <i>hsp65</i> .....	96



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações dos anticorpos monoclonais.....	65
Tabela 2 - Comparação da média $\pm$ DP do percentual das subpopulações leucocitárias em sangue periférico após tratamento com DTT e paraformaldeído ou diluição em PBS.....	78
Tabela 3 - Comparação da média $\pm$ DP dos índices médios de fluorescência (IMF) das subpopulações leucocitárias em sangue periférico após tratamento com DTT e paraformaldeído ou diluição em PBS .....	80
Tabela 4 - Média $\pm$ DP das porcentagens das subpopulações leucocitárias de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos presentes em amostras de escarro obtidas pelas técnicas de microscopia óptica e de citometria de fluxo .....	84
Tabela 5 - Resultado da baciloscopia das amostras do estudo .....	91
Tabela 6 - Número de indivíduos e porcentagens para as variáveis: hospital, gênero, tipo de infecção, sorologia ao HIV, radiografia, comorbidades e uso contínuo de medicamentos.....	91
Tabela 7 - Medidas de dispersão dos valores dos linfócitos T auxiliares/mm <sup>3</sup> de sangue periférico dos cinco pacientes portadores da coinfeção MTB/HIV .....	93
Tabela 8 - Valores de p para a associação de variáveis com os tipos de alterações radiológicas .....	97
Tabela 9 - Associação de variáveis entre pacientes soronegativos e soropositivos ao HIV com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos.....	98

Tabela 10 - Descrição das médias  $\pm$  DP, medianas e valores mínimos e máximos dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de escarro ..... 101

Tabela 11 - Associação dos subtipos de leucócitos presentes nas amostras de escarros de pacientes com tuberculose pulmonar soropositivos ou soronegativos ao HIV..... 104

Tabela 12 - Associação dos subtipos de leucócitos presentes das amostras de escarros de pacientes portadores e não portadores de tuberculose pulmonar (TB) ..... 107

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
APC	Células apresentadoras de antígenos (do inglês <i>Antigen-Presenting Cells</i> )
APC	Aloficocianina
APC-H7	Aloficocianina-cianina 7
APS	Separador Automático de Células (do inglês <i>Automatic Population Separator</i> )
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i> )
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CGMs	Células gigantes multinucleadas
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CS&T	<i>Cytometer Setup and Tracking Beads</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
FITC	Isotiocianato de fluoroceína
FSC	<i>Foward scatter</i>
<i>Gates</i>	Janelas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HU/UFSC	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleucina
IMF	Índice Médio de Fluorescência
IPP	Isopentanolpirofosfato
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
LBA	Lavado bronco-alveolar
LBMM	Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias

LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i> variante
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>Nitric Oxide</i> )
NOS-2	Óxido nítrico sintetase (do inglês <i>Nitric Oxide Synthase-2</i> )
<i>Nramp</i>	<i>Natural resistance associated macrophage protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pacific orange	Laranja pacífico
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Salin</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Ficoeritrina
PE-cy7	Ficoeritrina cianina 7
PerCP	Complexo proteína piridina de clorofila
<i>Primers</i>	Pares de oligonucleotídeos iniciadores
RH	Rifampicina e Isoniazida
RHZE	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol
SACL	Divisão de Análises Clínicas
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SP	Sangue periférico
SSC	<i>Side scatter</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T $\gamma\delta$	Linfócitos T gama/delta
TB	Tuberculose
TB-MDR	<i>M. tuberculosis</i> resistente a múltiplos fármacos
TB-XDR	<i>M. tuberculosis</i> extensivamente resistente
TCD4+	Linfócito T auxiliar
TCD8+	Linfócito T citotóxico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante – beta (do inglês <i>Transforming Growth Fator</i> )
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
Th17	Linfócito T auxiliar do tipo 17
TIR	<i>Toll</i> /receptor de IL-17
TLR	Receptores semelhantes a <i>Toll</i> (do inglês <i>Toll Like Receptor</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i> )





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>32</b>
2.1 TUBERCULOSE .....	32
2.1.1 <i>Definição da tuberculose</i> .....	32
2.1.2 <i>Epidemiologia da tuberculose</i> .....	33
2.1.3 <i>Transmissão da tuberculose</i> .....	33
2.1.4 <i>Desenvolvimento da tuberculose ativa</i> .....	33
2.1.5 <i>Manifestações clínicas</i> .....	34
2.1.6 <i>Tratamento</i> .....	35
2.1.7 <i>Diagnóstico</i> .....	36
2.1.7.1 Bacteriológico .....	36
2.1.7.2 <i>Cultura</i> .....	37
2.1.7.3 <i>Métodos Moleculares</i> .....	39
2.1.7.4 <i>Radiológico</i> .....	39
2.2 COINFEÇÃO TUBERCULOSE E HIV/AIDS .....	40
2.3 IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE .....	41
2.3.1 <i>Granuloma</i> .....	43
2.3.2 <i>Receptores semelhantes a Toll (TLR)</i> .....	46
2.3.3 <i>Imunidade inata</i> .....	47
2.3.4 <i>Resposta imune adquirida</i> .....	48
2.4 IMUNOLOGIA DA COINFEÇÃO HIV/M. TUBERCULOSIS ..	51
<b>3 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO .....</b>	<b>54</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	59
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	59
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
5.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	61
5.2 AMOSTRAS .....	61
5.2.1 <i>Amostras de escarro espontâneo</i> .....	61
5.2.2 <i>Amostras de sangue periférico</i> .....	61
5.3 CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS .....	62
5.4 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DE ESCARRO POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	63
5.4.1 <i>Obtenção de leucócitos do escarro</i> .....	63
5.4.2 <i>Citometria de Fluxo</i> .....	64
5.4.2.1 <i>Anticorpos monoclonais</i> .....	64
5.4.2.2 <i>Processamento das células do escarro isoladas</i> .....	65
5.4.2.3 <i>Controle de Qualidade</i> .....	66

5.4.3	<i>Análise dos dados pelo software Infinicyt</i> .....	67
5.4.4	<i>Validação da análise das populações leucocitárias por citometria de fluxo</i> .....	70
5.4.4.1	Citometria de Fluxo em sangue periférico .....	70
5.4.4.2	Análise microscópica .....	71
5.5	<b>IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS</b> .....	72
5.5.1	<i>Extração do DNA micobacteriano</i> .....	72
5.5.2	<i>Identificação da espécie por PCR seguida de análise de restrição – PRA- hsp65</i> .....	73
5.6	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	74
5.7	<b>FLUXOGRAMA DO ESTUDO</b> .....	75
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>77</b>
6.1	<b>PADRONIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA CELULARIDADE DO ESCARRO POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	77
6.1.1	<i>Citometria de amostras de sangue periférico</i> .....	77
6.1.2	<i>Imunofenotipagem de leucócitos em amostra de escarro por citometria de fluxo</i> .....	82
6.1.3	<i>Comparação das subpopulações leucocitárias obtidas pelos métodos de Microscopia Óptica e de Citometria de Fluxo</i> .....	84
6.2	<b>DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA</b> .....	89
6.3	<b>IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE MICOBACTÉRIA</b> .....	95
6.4	<b>ASSOCIAÇÕES DE VARIÁVEIS COM OS TIPOS DE ALTERAÇÕES RADIOLÓGICAS</b> .....	97
6.5	<b>ASSOCIAÇÃO DE VARIÁVEIS ENTRE PACIENTES SORONEGATIVOS E SOROPOSITIVOS AO HIV</b> .....	98
6.6	<b>CELULARIDADE DAS AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA E BACILÍFEROS</b> .....	100
6.7	<b>ASSOCIAÇÃO DA CELULARIDADE DAS AMOSTRAS DE ESCARRO ENTRE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA BACILÍFEROS E SORONEGATIVOS OU SOROPOSITIVOS AO HIV</b> .....	103
6.8	<b>ASSOCIAÇÃO DA CELULARIDADE DAS AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES NÃO PORTADORES E PORTADORES DA TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA</b> .....	106
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>109</b>
7.1	<b>PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS PRESENTES NO ESCARRO POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	109

7.2 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA E ASSOCIAÇÕES DE VARIÁVEIS ENTRE OS INDIVÍDUOS COM E SEM A COINFEÇÃO HIV/MTB .....	114
7.3 A AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DO ESCARRO DE PACIENTES SORONEGATIVOS E SOROPOSITIVOS AO HIV ...	121
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
<b>9 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO B - TCLE ESCARRO.....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO C – TCLE SANGUE PERIFÉRICO.....</b>	<b>159</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), também denominado bacilo de Koch (LEÃO; PORTAELS, 2007). O MTB é transmitido diretamente de pessoa para pessoa, principalmente por vias aéreas, através da inalação de partículas infectadas com bacilos provenientes do trato respiratório de indivíduos com tuberculose respiratória ativa e bacilíferos (CAMPOS, 2006; LEÃO; PORTAELS, 2007; PHILIPS; ERNST, 2012).

A TB é considerada um problema de saúde pública mundial. A cada ano, são registrados, aproximadamente, 9 milhões de novos casos de TB em todo o mundo e 1,4 milhões de mortes decorrentes da doença (WHO, 2013). No Brasil, estima-se que mais de 64 milhões de pessoas estejam infectadas com o bacilo da TB e que, por ano, haja o desenvolvimento de 69 mil novos casos e 4.600 mortes pela TB (BRASIL, 2012).

Após infecção pelos bacilos da TB, ocorre o desencadeamento de uma resposta imune, (RI) predominantemente celular, a qual envolve diferentes tipos de células, como macrófagos e monócitos, neutrófilos, diversos subtipos de linfócitos e células dendríticas. As células fagocíticas mononucleares agem na RI desde os eventos iniciais após a infecção e têm um papel crucial no desenvolvimento da doença (ERNST, 2012). Os linfócitos T auxiliares (TCD4+), especialmente do tipo 1 (Th1), produzem importantes citocinas da resposta imune, tais como: interferon gamma (IFN-  $\gamma$ ), um potente ativador de macrófagos e indutor da produção de substâncias microbicidas por estes fagócitos; o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), que estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção e promove a ativação dessas células; e a interleucina 2 (IL-2), que estimula a expansão clonal e outras citocinas (KAUFMANN, 2001; BATISTA et al., 2006; ABBAS; LICHTMAN ; PILLAI, 2011; TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011).

Os indivíduos infectados pelo MTB podem desenvolver tanto uma doença progressiva quanto uma infecção latente, dependendo do seu estado imunológico. Em pacientes imunocompetentes, o patógeno pode ficar dentro das células hospedeiras durante toda a vida, sem manifestar a doença. No entanto, em pacientes imunologicamente comprometidos, o bacilo pode se disseminar por via linfática e hematológica, infectando principalmente os pulmões (tuberculose

pulmonar) ou afetando outros sítios anatômicos, tais como: ossos, rins e meninges (tuberculose extrapulmonar) ou também se alojando de forma disseminada (tuberculose miliar) (PANTALEO, GRAZIOSI; FAUCI, 1993; SHARMA; MOHAN, 2004).

Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), caracterizada como uma disfunção grave do sistema imunológico de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SANTOS; BECK, 2009; BASTOS et al., 2012), houve um profundo impacto sobre o aumento do número de novos casos de tuberculose. A interação entre MTB e HIV ocorre de forma bidirecional e sinérgica, o que leva ao agravamento de ambas as infecções, pois, o HIV promove a progressão da TB latente para TB ativa, enquanto o MTB promove aumento da replicação viral e acelera evolução natural do HIV (RAJA, 2004; SILVA; ROSA; LEMOS, 2006; PALMERO, 2007; KWAN; ERNST, 2011).

Apesar da forte correlação entre o desenvolvimento da TB e a diminuição de células TCD4+ no sangue periférico em indivíduos coinfetados pelo TB/HIV estar bem estabelecida, a resposta imune celular que ocorre dentro dos pulmões, quando infectados pelos dois patógenos, permanece incerta.

Informações relacionadas à citologia do escarro de pacientes com TB são escassas e não se sabe exatamente se há diferença na resposta imuno celular pulmonar local entre os pacientes HIV soropositivos e HIV soronegativos. Estas observações reforçam a importância da pesquisa para o desenvolvimento e avaliação de técnicas que permitam o estudo das células que envolvem a resposta imune pulmonar no combate à infecção pelo MTB, principalmente nos casos de indivíduos HIV soropositivos, os quais têm maior probabilidade de desenvolvimento da TB do que os indivíduos imunocompetentes.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TUBERCULOSE

#### 2.1.1 Definição da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por espécies de micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), as quais possuem grandes semelhanças entre si e 99,9% de identidade genética, o que permite agrupá-las em um mesmo complexo, embora apresentem diferenças quanto a reservatórios naturais, patogenicidade e características fenotípicas e epidemiológicas. O CMTB é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, agente da TB humana; *M. africanum*, também causador da TB humana, mas encontrado com maior frequência no continente africano; *M. bovis*, principal agente da TB bovina; *M. bovis* – *Bacille Calmette-Guérin* (BCG), derivado de *M. bovis*, utilizado na produção da vacina antituberculose; *M. bovis* subespécie *caprae*, agente causador da TB em caprinos; *M. microti*, causador da TB em roedores; *M. canettii*, variante de *M. tuberculosis*, presente na região da Somália e *M. pinnipedii*, agente da TB em leões marinhos e em humanos (NIEMANN; RICHTER; RÜSCH-GERDES, 2000; BROSCHE et al., 2002; COUSINS et al., 2003; LOBUE; ENARSON ; THOEN, 2010).

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), descrito em 1882, por Robert Koch e por isso, também denominado bacilo de Koch, caracteriza-se como um microorganismo intracelular, aeróbio ou microaerófilo, de crescimento lento e de virulência variável, sendo o ser humano o seu principal reservatório. Com relação a sua morfologia, o MTB é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não encapsulado e que mede de 1 a 10µm de comprimento por 0,2 a 0,6µm de largura (LEÃO; PORTAELS, 2007; CAMPOS, 2006; BARRERA, 2007).

Ao invadir o hospedeiro, o bacilo se dissemina por via hematológica e/ou linfática pelo corpo e, dependendo do local em que se aloja, há o desenvolvimento de um tipo específico da doença. Devido à afinidade de MTB pelas células do pulmão, o tipo de tuberculose mais frequente é a pulmonar. Ossos, linfonodos e meninges são exemplos de sítios anatômicos para o desenvolvimento da TB fora dos pulmões, ou seja, da TB extrapulmonar, que acomete aproximadamente 15% dos casos de TB (RAJA, 2004; SHARMA; MOHAN, 2004). O bacilo pode



ainda se alojar de forma disseminada pelo organismo, ocasionando o quadro característico da TB miliar (SHARMA; MOHAN, 2004).

### **2.1.2 Epidemiologia da tuberculose**

A TB é considerada, atualmente, uma emergência sanitária global, principalmente em países em desenvolvimento, onde estão presentes 80% dos casos mundiais. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que, em 2012, ocorreram cerca de 8,6 milhões de novos casos de TB e aproximadamente 4000 mortes diárias em decorrência dessa doença. Atualmente, a TB ocupa o segundo lugar no *rank* mundial de mortes causadas por doenças infecciosas, perdendo somente para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2013). No Brasil, o quadro epidemiológico da TB também é preocupante. Em 2012, foram notificados aproximadamente 70 mil novos casos de TB no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Com relação à taxa de mortalidade associada a TB, embora ela tenha sido diminuída pela metade desde 1990, o número ainda é significativo, chegando a 4.659 mortes em 2010 (BRASIL, 2013b).

### **2.1.3 Transmissão da tuberculose**

Comumente, a transmissão de MTB se dá de forma direta, ou seja, de pessoa para pessoa, principalmente pelo ar, através da inalação de partículas geradas pela fala, tosse ou espirro contendo o bacilo, provenientes do trato respiratório de indivíduos com tuberculose respiratória ativa e bacilíferos. A transmissão ocorre de forma plena enquanto o tratamento não for iniciado, sendo assim, após início do esquema terapêutico, a transmissão é reduzida gradativamente, alcançando níveis insignificantes ao fim de poucos dias ou semanas (CAMPOS, 2006; PHILIPS; ERNST, 2012).

### **2.1.4 Desenvolvimento da tuberculose ativa**

Indivíduos infectados por MTB não necessariamente desenvolverão a doença ativa. A probabilidade de desenvolvimento da TB é diretamente proporcional ao número de bacilos infectantes, à virulência de MTB presente no local da infecção e à reação de

hipersensibilidade que o bacilo provoca no organismo infectado. Além disso, o desenvolvimento da imunidade natural e adquirida pelo hospedeiro exerce influência inversamente proporcional na ocorrência da TB e são de extrema importância na resistência ao bacilo (CAMPOS, 2006; LEÃO; PORTAELS, 2007). Aproximadamente 90% dos indivíduos infectados pelo MTB não desenvolverão a doença. O bacilo permanecerá em estado dormente, caracterizado como latente, com a possibilidade de reativar-se tardiamente, conforme as condições imunitárias do hospedeiro, principalmente nos dois primeiros anos de infecção (CAMPOS, 2006; PHILIPS; ERNST, 2011).

Diversos fatores são capazes de alterar a resposta imunológica, como o uso de fármacos imunossupressores - a exemplos dos corticoides -, carências nutricionais, confinamento em locais fechados - como presídios -, *diabetes mellitus*, neoplasias e, sobretudo, infecção pelo HIV. Esses fatores aumentam a susceptibilidade a infecções por patógenos intracelulares, como o MTB (MOUTINHO, 2011).

### **2.1.5 Manifestações clínicas**

Os sinais e sintomas mais comuns da TB pulmonar são tosse seca e contínua no início, seguida por presença de secreção por mais de três semanas, astenia, febre baixa, geralmente vespertina, sudorese noturna, inapetência, palidez, emagrecimento acentuado e prostração. Nas situações graves, é possível encontrar casos com dispneia, hemoptise maciça e empiema pleural. A TB pulmonar também pode se apresentar clinicamente na forma assintomática ou com sintomas brandos pouco característicos, podendo este quadro persistir por meses ou até anos (GUTIERREZ et al., 2001; CAMPOS, 2006).

Concomitantes a TB pulmonar ou isoladamente, nas infecções pelo MTB podem ocorrer o desenvolvimento das formas extrapulmonares, como a pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, geniturinária, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal (GUTIERREZ et al., 2001; LOPES; GOMES; DIOGO, 2011). Os sintomas relacionados com essas formas de TB são inespecíficos, cursando com febre, anorexia, perda de peso, mal-estar, cefaléia e fadiga, e/ou por sinais e sintomas relacionados com o sítio anatômico extrapulmonar atingido pelo bacilo (SHARMA; MOHAN, 2004).

## 2.1.6 Tratamento

O tratamento da TB é baseado em poliquimioterapia e tem por finalidade eliminar o foco da infecção e interromper a cadeia de transmissão. O esquema de primeira linha é composto por duas fases de tratamento. A primeira, denominada fase intensiva do tratamento, consiste na administração de um comprimido diário com dose fixa combinada dos quatro fármacos, Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (RHZE), por um período de dois meses. Em seguida, realiza-se a segunda fase do tratamento, denominada fase de manutenção, caracterizada pela administração de cápsulas de Rifampicina e Isoniazida (RH) por mais quatro meses (BRASIL, 2013a). As associações medicamentosas adequadas, administradas nas doses corretas, combinadas com o uso por tempo suficiente, têm alta eficácia e são os melhores meios para se evitar a persistência bacteriana e a conseqüente seleção de cepas resistentes aos fármacos (LOBUE; ENARSON; THOEN, 2010; BRASIL, 2013a). Entretanto, a terapia em longo prazo, somada aos efeitos adversos dos medicamentos, contribuem para baixa adesão do paciente, o que resulta em falência do tratamento e desenvolvimento de linhagens de MTB resistentes a um ou mais fármacos (ROSSETTI et al., 2002).

Uma das maiores dificuldades no combate do MTB surgiu com o desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos de primeira linha em consequência de tratamentos inadequados, os quais, após iniciados, tiveram má adesão ou foram abandonados antes do seu término, resultando em doses insuficientes para erradicação da micobactéria no indivíduo infectado (DALCOLMO; ANDRADE; PICON, 2007).

Primeiramente, houve a identificação das cepas resistentes principalmente a Rifampicina e Isoniazida, ou a estes e outros fármacos de primeira linha, classificadas como *M. tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos (TB-MDR) (ROSSETTI et al., 2002). Em 2006, cepas ainda mais agressivas foram descobertas, denominadas cepas extensivamente resistentes (TB-XDR) e que apresentam resistência a Rifampicina, Isoniazida, qualquer fluoroquinolona e mais um dos três fármacos injetáveis de segunda linha (LOPES; GOMES; DIOGO, 2011; WHO, 2013). Estas cepas requerem esquemas de tratamento mais longos (período mínimo 20 meses), com a utilização de fármacos de segunda linha, menos efetivos e de alto custo (LOBUE, ENARSON ; THOEN, 2010).

## 2.1.7 Diagnóstico

### 2.1.7.1 Bacteriológico

O diagnóstico laboratorial de micobactérias para a investigação da TB pode ser realizado a partir de amostras provenientes de vários sítios anatômicos, dependendo da forma da doença a ser investigada, se TB pulmonar ou extrapulmonar (WAARD; ROBLEDO, 2007).

Quando houver a suspeita de TB pulmonar, as amostras indicadas para o isolamento do bacilo são: escarro (espontâneo ou induzido), lavado bronco-alveolar (LBA), escovado brônquico, fragmento de tecido pulmonar, aspirado transtraqueal e lavado gástrico. Dessas, o escarro espontâneo é a amostra clínica mais utilizada, devido a sua riqueza bacilar e a sua facilidade de obtenção (BRASIL, 2008);

O escarro espontâneo é corresponde ao material expectorado, proveniente do trato respiratório inferior, obtido após esforço de tosse e eliminado pela boca. Porém, ao transitar pela orofaringe e boca, ele se mistura com secreções desses locais que podem interferir na qualidade da amostra. Desta forma, considera-se uma amostra de escarro de boa qualidade aquela que contém material mucopurulento, com um volume ideal de 5 a 10 mL e com quantidade mínima de material originado na boca e no nariz. Além disso, amostras representativas do trato respiratório inferior são aquelas que possuem macrófagos alveolares, polimorfonucleares e células do epitélio cilíndrico ciliado, em detrimento de células epiteliais escamosas (BRASIL, 2008; SILVA et al., 2009).

As micobactérias, embora sejam classificadas como bactérias Gram-positivas pelas características da sua parede celular, não são coradas pelo método de Gram, mas sim, por técnicas contendo o corante carbolfucsina, como as de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun, que conferem coloração vermelha aos bacilos. Por possuírem alto teor de lipídeos em sua parede celular, como os ácidos micólicos, que formam uma barreira hidrofóbica, as micobactérias resistem à dessecação, a diversos agentes químicos e antibióticos e à descoloração por álcool e ácido. Devido a essa última característica, receberam a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; TORTORA, FUNKE & CASE, 2006; BARRERA, 2007; COOK et al., 2009; FALKINHAM, 2009).

A baciloscopia consiste no método de pesquisa de BAAR, em um esfregaço de amostra clínica corado pela técnica de Ziehl Neelsen (principal técnica utilizada no Brasil) e observado ao microscópio de campo claro de forma padronizada. A baciloscopia possui grande importância no diagnóstico da TB por ser de baixo custo, fácil execução, rápida e por detectar casos bacilíferos, ou seja, aqueles casos em que o indivíduo está eliminando o bacilo e, por isso, além de estar doente, pode infectar outras pessoas. Diante da suspeita de TB pulmonar ativa, a baciloscopia é o primeiro exame a ser solicitado, utilizando-se, preferencialmente, amostra de escarro espontâneo (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011).

A avaliação das baciloscopias, conforme padronização do Ministério da Saúde, deve ser feita em objetiva de 100x com imersão e da seguinte maneira: Primeiramente, realiza-se a leitura de 20 campos e, em seguida, estabelece-se a média de BAAR/campo. Se a média for de 1 a 10 BAAR/campo, relata-se o resultado como positivo ++++. Caso não atinja, pelo menos, a média de 1 BAAR/campo, continua-se à leitura até totalizar 50 campos e então, calcula-se novamente a média. A média de 1 a 10 BAAR/campo nos 50 campos deve ser reportada como positivo ++. Se ainda assim não for encontrado, no mínimo 1 BAAR/campo, continua-se a leitura até atingir 100 campos. Soma-se todos os BAAR encontrados em 100 campos, se o resultado da soma for de 10 a 99 BAAR, relata-se como positivo +, mas se o resultado da soma for de 1 a 9 BAAR nos 100 campos, relata-se o número de BAAR encontrados. Quando não for encontrado BAAR em 100 campos, relata-se o resultado como negativo (BRASIL, 2008).

Embora todas as vantagens da baciloscopia, ela possui uma baixa sensibilidade, variando de 50 a 80%, sendo necessários, pelo menos, de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro para se obter um resultado positivo.

### *2.1.7.2 Cultura*

A cultura caracteriza-se por um método de diagnóstico mais sensível do que a baciloscopia, com a capacidade de detectar a partir de 10 bacilos viáveis/mL de amostra. Esse método é considerado referência (padrão-ouro) para o diagnóstico e também para a avaliação de novas metodologias diagnósticas (BRASIL, 2008; BENTO et al., 2011; BRASIL, 2011). Além disso, a cultura permite a posterior identificação

da espécie de micobactéria isolada e a realização do teste de sensibilidade a fármacos antituberculose (WAARD; ROBLEDO; BRASIL, 2008). A sua grande desvantagem é que ela produz resultados mais tardios por depender do crescimento lento micobacteriano, variando de 14 a 28 dias até 8 semanas, nos casos de amostras paucilacilares (poucos bacilos) (BRASIL, 2011).

Para a realização da cultura, amostras clínicas são semeadas em meios específicos para micobactérias, principalmente em meios de cultura sólidos à base de ovo, como *Löwenstein-Jensen* e *Ogawa-Kudoh* e em meios líquidos que compõem sistemas comerciais de cultivo. A cultura líquida é mais rápida e a sua automação permite o monitoramento por um sistema informatizado que detecta o crescimento celular (RAMACHADRAN; PARAMASIVAN, 2003; BRASIL, 2008; BENTO et al., 2011; BRASIL, 2011).

A realização da cultura tem por objetivos melhorar a sensibilidade diagnóstica em casos específicos, controlar o tratamento e fazer vigilância da resistência aos tuberculostáticos (Quadro 1) (BRASIL, 2011).

Quadro 1 - Casos em que realização de cultura é indicada

<b>A cultura para micobactéria é indicada nos seguintes casos:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Suspeita clínica e/ou radiológica de TB com baciloscopia repetidamente negativa;</li> <li>-Suspeitos de TB com amostras paucibacilares (poucos bacilos);</li> <li>-Suspeitos de TB com dificuldades de obtenção da amostra (por exemplocrianças);</li> <li>-Suspeitos de TB extrapulmonar;</li> <li>-Casos suspeitos de infecções causadas por MNT;</li> </ul>
<b>Cultura com identificação e teste de sensibilidade, independentemente do resultado da baciloscopia está indicada nos seguintes casos:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pacientes com antecedentes de tratamento prévio independentemente do tempo decorrido;</li> <li>-Pacientes imunodeprimidos, principalmente portadores de HIV;</li> <li>-Paciente com baciloscopia positiva no final do 2º mês de tratamento;</li> <li>-Falência ao tratamento anti-TB;</li> <li>-Em investigação de populações com maior risco de albergarem</li> </ul>

cepa de *M. tuberculosis* resistente (profissionais de saúde, população de rua, privados de liberdade, pacientes internados em hospitais que não adotam medidas de biossegurança e instituições de longa permanência) ou com difícil abordagem subsequente (indígenas);

Fonte: Brasil 2011

### 2.1.7.3 Métodos Moleculares

Devido à necessidade de métodos diagnósticos mais rápidos e sensíveis para TB houve o desenvolvimento de testes moleculares para detecção e identificação das espécies de micobactérias diretamente de amostras clínicas ou a partir de colônias isoladas em cultivo. As técnicas que promovem amplificação de ácidos nucleicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e suas variações (*Nested-PCR*, *Multiplex-PCR* e PCR em tempo real, por exemplo), são as mais utilizadas com finalidade de diagnóstico. Com relação às técnicas moleculares para identificação das espécies, pode-se citar as que empregam sondas genéticas (Sistemas *AccuProbe*® e *INNO-LiPA*, por exemplo), sequenciamento de DNA, análises com enzimas de restrição (como o *PRA-hsp65*) (WILLIAMS et al., 2007; NEONAKI et al., 2008; WILSON, 2011). Embora o desenvolvimento dessas metodologias mais avançadas, a bacterioscopia e a cultura — ainda são as recomendadas para o diagnóstico de TB ativa, especialmente em países com poucos recursos (WAARD; ROBLEDO, 2007).

### 2.1.7.4 Radiológico

Em casos de suspeita de tuberculose pulmonar, exames radiológicos são indicados para os indivíduos sintomáticos que apresentam bacterioscopia negativa, bem como para os indivíduos que não conseguem produzir escarro. Nos casos em que a bacterioscopia for positiva, o raio-X é indicado para a exclusão da presença de doenças pulmonares associadas (que quando presentes, também devem ser tratadas) e também para o acompanhamento da evolução da tuberculose, principalmente em pacientes que não são responsivos ao tratamento. O exame radiológico também permite detectar casos de infecção latente pela presença de imagens sugestivas de lesões cicatriciais (KRITSKI; MELO, 2007; BRASIL, 2011)

Os indivíduos com tuberculose pulmonar apresentam anormalidades radiológicas com grande frequência, porém casos de lesão endobronquial podem não estar associados com alterações radiológicas. A tuberculose primária, isto é, decorrente de infecções recentes, usualmente possui infiltração na zona média ou apical e em geral está associada com adenopatia hilar ipsilateral. Atelectasia pode estar presente como resultado da compressão das vias aéreas com o aumento do linfonodos, sendo esta manifestação mais comum em crianças. Se o primeiro processo persistir até o momento em que for desenvolvida a resposta imune específica mediada por células, o exame radiológico pode ainda detectar a presença de cavitações pulmonares. Pacientes coinfectados pelo HIV com função do sistema imune afetada, ou seja, com baixa contagem de linfócitos T auxiliares (TCD4+), geralmente não apresentam características radiológicas clássicas da TB pulmonar e apresentam mais exames radiológicos normais quando comparadas com indivíduos sem supressão imunológica (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; BENTO et al., 2011).

## 2.2 COINFEÇÃO TUBERCULOSE E HIV/AIDS

O HIV é um vírus pertencente ao gênero *Lentivirinae* família *Retroviridae* (ATWOOD et al., 1993), o qual se apresenta em dois tipos, o HIV-1, que é o prevalente no Brasil e no mundo, e o HIV-2, com maior prevalência na África (SANTOS; BECK, 2009). O HIV possui afinidade por células específicas do sistema imunológico e, ao infectá-las, poderá comprometer o funcionamento e a viabilidade celular, o que resulta no desenvolvimento aids, reconhecida em 1980 (PANTALEO et al., 1993). A TB é a infecção oportunista mais frequente e a principal causa de morte em pacientes portadores de HIV (CHEN et al., 2011). Pessoas infectadas pelo bacilo da TB e pelo vírus do HIV, possuem muito mais chance de desenvolver a tuberculose ativa, se forem comparadas com indivíduos HIV soronegativos (TOOSSI, 2003). Dados apontam que, em 2011, aproximadamente 13% (1,1 milhão) das pessoas que desenvolveram TB no mundo eram HIV soropositivas e que 0,4 milhão de mortes causadas por TB tratavam-se de pacientes com a coinfeção (WHO, 2013).

A interação entre MTB e HIV que ocorre em pacientes coinfectados é bidirecional e sinérgica, o que leva ao agravamento de ambas as infecções: o HIV promove a progressão da TB latente para TB



ativa, enquanto o MTB, por sua vez, favorece o aumento da replicação viral e acelera a evolução natural do HIV (RAJA, 2004; PALMERO, 2007; KWAN; ERNST, 2011). A infecção pelo HIV é considerada o maior fator de risco para TB, e suas altas taxas de prevalência são significativamente correlacionadas com altas taxas de incidência da TB (TOOSSI, 2003; KWAN; ERNST, 2011). A incidência dos casos fatais de TB foi mais de duas vezes maior em pessoas infectadas com o HIV (37%), se comparadas com aquelas não infectadas (16%) (GETAHUN et al., 2010). Estes números podem ser explicados por uma combinação de fatores associados à coinfeção: (i) rápida progressão da doença devido a incapacidade do sistema imunológico de restringir o crescimento de MTB, (ii) diagnóstico e tratamento tardios da TB devido a apresentação clínica atípica e menor índice de amostras de escarros positivos para pacientes HIV soropositivos, (iii) diagnóstico tardio da infecção pelo HIV devido ao estigma ou falta de testes diagnósticos de HIV em centros de diagnóstico de TB. Desta forma, a coinfeção HIV/MTB contribui substancialmente para o aumento da morbidade e mortalidade associada a TB (KWAN; ERNST, 2011). No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) recomenda que seja ofertado o teste para HIV para todos os pacientes com TB ativa (BRASIL, 2011). Além disso, deve-se investigar, periodicamente, a possibilidade de TB em pessoas vivendo com HIV/aids (SANTOS; BECK, 2009).

### 2.3 IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE

O desenvolvimento da TB e das suas manifestações clínicas depende do balanço entre a virulência do microrganismo e a capacidade imunológica do hospedeiro, resultante da combinação da resposta imune inata com a resposta imune adquirida (MOUTINHO, 2011; BASTOS et al., 2012). Essa interação pode desencadear resolução da infecção, controle do patógeno ou estabelecimento de infecção latente ou desenvolvimento de doença ativa (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011).

A TB é transmitida de pessoa a pessoa por meio da inalação de aerossóis contendo o bacilo *M. tuberculosis*. Esses aerossóis são provenientes do trato respiratório de indivíduos portadores de TB pulmonar ativa e bacilíferos (RAJA, 2004; PHILIPS; ERNST, 2012).

Os aerossóis (1 a 5  $\mu$ ) têm capacidade de atravessar os bronquíolos e de se depositarem nos espaços alveolares, onde são fagocitados por macrófagos e células dendríticas alveolares. Dessa maneira, por estarem localizados no parênquima pulmonar e não no tecido mucoso das vias aéreas, a migração para o linfonodo ocorre de forma muito mais lenta. Esse atraso se justifica pela resistência dos macrófagos e das células dendríticas alveolares à migração e à ativação. Essa resistência, provavelmente, é fundamental para a manutenção da capacidade do espaço alveolar como uma superfície de troca de ar, em oposição a uma doença inflamatória local (COOPER, 2008; O'GARRA et al., 2013).

Em seguida, o bacilo se dissemina por via linfática, primeiramente para os linfonodos que drenam os pulmões e, posteriormente, por via sistêmica, podendo alojar-se em diversos órgãos, preferencialmente nos pulmões, devido à grande oferta de oxigênio no local (RAJA, 2004; MOUTINHO, 2011). A disseminação das bactérias até os órgãos linfáticos é essencial para o desenvolvimento da resposta imune celular adaptativa que ocorre primeiramente nos linfonodos (MOUTINHO, 2011; TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011).

Além do atraso no desenvolvimento da resposta imune mais especializada, devido à sua localização imunoprivilegiada, o MTB desenvolve mecanismos de resistência a defesas do hospedeiro. Na maioria dos casos, os microrganismos fagocitados são degradados por hidrolases ácidas intralisossomais pela fusão fagolisossômica dos fagócitos (RAJA, 2004). Porém, o MTB modula o tráfego e a maturação dos fagossomas nos quais os bacilos residem e inibem a fusão com o lisossoma, escapando do mecanismo lisossomal de restrição, morte e degradação (KAUFMMAN, 2001; ERNST, 2012). Ainda assim, os macrófagos desenvolvem outros mecanismos de morte micobacteriana, como a produção de espécies reativas de oxigênio, geradas por via oxidativa (RAJA, 2004). Além disso, ao serem ativadas por interferon-gama (INF- $\gamma$ ) e pelo fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), os fagócitos produzem óxido nítrico sintetase (NOS-2) que gera altas concentrações de óxido nítrico (NO) e de outros radicais intermediários de nitrogênio, os quais possuem ação bactericida, mas não são suficientes para eliminar todos os bacilos. Evidências indicam que o MTB desenvolve mecanismos que neutralizam essas substâncias (MOUTINHO, 2011; O'GARRA et al., 2013).

Apoptose celular consiste em outro sistema de defesa do fagócito contra os microrganismos, além da indução da lise do patógeno (RAJA,

2004). Entretanto, o MTB possui diversos mecanismos que inibem a apoptose, o que prolonga a sobrevivência das células infectadas e permite o crescimento do número de bacilos acumulados antes de serem liberados no processo de morte celular. As micobactérias também utilizam diversos mecanismos de virulência para sua disseminação de célula para célula como, por exemplo, o sistema de secreção ESX1 tipo VII que promove a morte por necrose das células infectadas pelo bacilo e o recrutamento de macrófagos. Isso permite que as bactérias sejam liberadas para as novas células, favorecendo o crescimento bacteriano intracelular (ERNST, 2012).

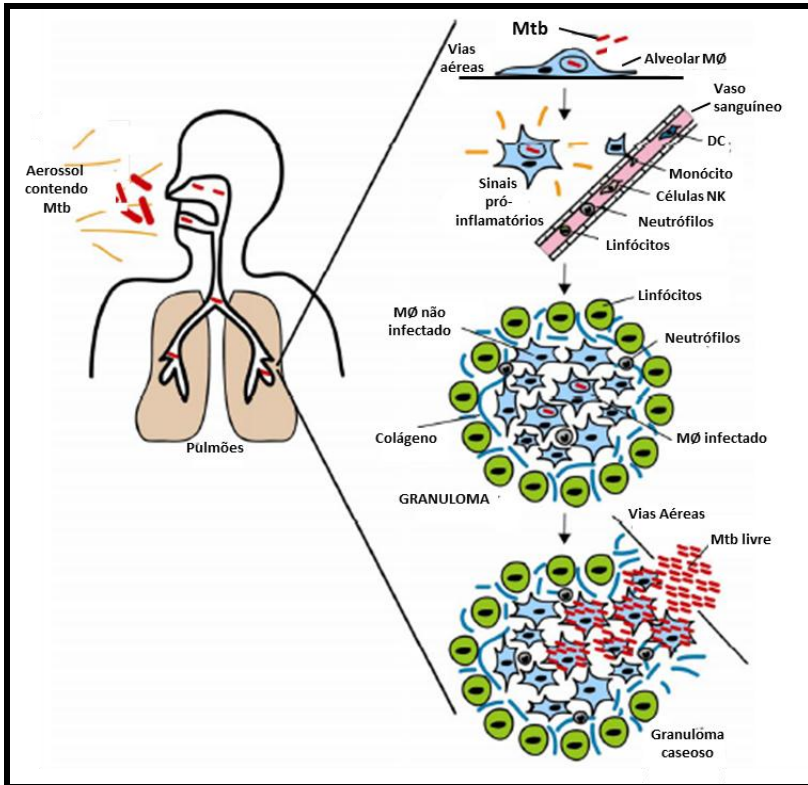
Do mesmo modo, o MTB diminui a habilidade das células apresentadoras de antígeno (APC) de processar e apresentar os antígenos para as células TCD4+, as quais são extremamente importantes na defesa do organismo contra o bacilo. Além disso, as APC infectadas pelo MTB produzem citocinas, como fator de crescimento transformante – beta (TGF- $\beta$ ), Interleucina 10 (IL-10) e Interleucina 6 (IL-6), que contribuem para o desencadeamento da proliferação bacilar e de defeitos nas funções exercidas pelas células T (RAJA, 2004; COOPER, 2008; ERNST, 2012).

Portanto, o início tardio da resposta imune celular especializada é uma combinação entre o crescimento lento do MTB associado a um mecanismo de resistência micobacteriana e a sua localização natural imunoprivilegiada no tecido alveolar (COOPER, 2008).

### **2.3.1 Granuloma**

Os granulomas são lesões histopatológicas clássicas da TB que se desenvolvem 15 a 18 dias após a infecção pelo MTB. Por conterem a infecção persistente e por acumularem células do sistema imune no local, os granulomas beneficiam tanto o hospedeiro como o patógeno. Esse conceito é o oposto do que se acreditava antigamente, no qual o granuloma era considerado uma “parede” que barrava a infecção e a disseminação do bacilo (RAJA, 2004; PHILIPS; ERNST, 2012). Diversas células compõem o granuloma, como os neutrófilos, os monócitos/macrófagos, os linfócitos T e B, as células dendríticas e os fibroblastos (RAJA, 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Formação e composição do granuloma



Adaptado de Russell (2007) e Welin (2011).

Os macrófagos alveolares residentes (MØ) fagocitam as bactérias inaladas. A fagocitose induz uma resposta pró-inflamatória e o recrutamento de outras células do sistema imune inato e adaptativo para o local da infecção, culminando na formação granuloma. O bacilo pode ficar contido dentro dessa estrutura durante toda a sua vida, porém se houver falhas nos mecanismos de controle pelo sistema imunológico, o bacilo se desenvolverá, e a sua replicação e ação local levará ao desenvolvimento de um núcleo necrótico. O granuloma então, poderá se romper, favorecendo a migração dos bacilos para as vias aéreas.

Os macrófagos, células CD14<sup>+</sup> que se acumulam nos granulócitos, possuem diversos fenótipos, como os de macrófagos

maduros, macrófagos epiteliais, macrófagos espumosos e células gigantes multinucleadas (CGMs) ou células gigante de Langhans (COOPER, 2009).

Os macrófagos espumosos são células vacuolares, que expressam CD205 (COOPER, 2009) e contêm grande quantidade de lipídeos no seu interior, os quais são utilizados pelo MTB como fonte de carbono e energia (CAMPOS, 2006; PHILIPS; ERNST, 2012). As CGMs são células formadas pela fusão da membrana plasmática (mas não da membrana nuclear) de múltiplos macrófagos, fagocitam partículas micobacterianas de forma pouco eficiente e expressam altas concentrações de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo II (PHILIPS; ERNST, 2012).

Muitos macrófagos não infectados também são recrutados para o local da infecção e localizam-se ao redor daqueles infectados, servindo de “novos abrigos” para os bacilos provenientes das células hospedeiras que sofreram morte celular (MOUTINHO, 2011; PHILIPS; ERNST, 2012).

As células dendríticas expressam os marcadores CD11b<sup>high</sup> e CD11c<sup>high</sup> e caracterizam-se por serem fagócitos especializados na apresentação de antígenos para os linfócitos T. Elas possuem a capacidade de migrar do local da infecção para os linfonodos que drenam os pulmões, sendo essa migração muito importante para o desenvolvimento da imunidade especializada (PHILIPS; ERNST, 2012; O’GARRA et al., 2013).

Com relação aos linfócitos presentes no granuloma, os linfócitos T (aproximadamente 70% com fenótipo TCD4+) interagem com os macrófagos ativados por INF- $\gamma$  e, embora não sejam essenciais para o início da sua formação, estão presentes nos granulomas maduros e contribuem para a manutenção da organização local e para o controle da progressão do bacilo após a fase aguda da infecção. Os linfócitos B, embora ainda não se conheça ao certo qual é a sua contribuição no granuloma, estudos revelam que ele possui grande importância imunorreguladora durante a infecção crônica pelo MTB (PHILIPS; ERNST, 2012).

Os bacilos da TB podem permanecer durante toda sua vida dentro do granuloma, caracterizando o estado latente da infecção, ou sofrer reativação (RAJA, 2004; MOUTINHO, 2011). Quando reativados, crescem exponencialmente e levam os macrófagos infectados à morte, desenvolvendo um processo de inflamação local e, conseqüentemente, de caseificação (RAJA, 2004).

A TB cavitária é a consequência da destruição do tecido pulmonar que causa formação de espaços macroscópicos abertos que contêm numerosos bacilos do MTB. Por se conectar com as vias aéreas, as cavitações facilitam a expectoração das micobactérias (ERNST, 2012). Com o desenvolvimento da doença ativa e formação das cavidades, um indivíduo pode infectar aproximadamente 15 pessoas anualmente, sendo que o risco de contágio entre contatos intradomiciliares ou institucionais é de 5 a 20% e de 0,2 a 2% entre contatos casuais (KAUFMMAN, 2001; CAMPOS, 2006, WHO, 2013).

As citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  regulam localmente a concentração de quimiocinas no granuloma, as quais estimulam o recrutamento de células de defesa para o local, prevenindo a reativação do MTB. A neutralização de TNF- $\alpha$  pode resultar em reativação fatal da doença (MOUTINHO, 2011).

Quando não há o controle da infecção, o desenvolvimento do processo inflamatório do pulmão culmina nas manifestações clínicas comuns da TB como tosse, febre, sudorese noturna, anorexia e perda de peso (GUTIERREZ et al., 2001). A progressão para a cronicidade pode causar fibrose, que é a última tentativa de defesa do organismo no combate da disseminação do bacilo, levando ao desenvolvimento de sequelas, como a baixa elasticidade da área pulmonar que foi infectada (MONTINHO, 2011).

### 2.3.2 Receptores semelhantes a Toll (TLR)

A imunidade celular é o principal mecanismo de defesa contra o MTB, e tanto a resposta mediada pela imunidade inata quanto pela adquirida depende de um grande grau do reconhecimento do MTB como um patógeno pelos receptores de reconhecimento padrão. Receptores semelhantes a *Toll* (TLR) consistem em uma família evolutivamente conservada de receptores de reconhecimento de padrões, os quais são expressos em muitos tipos celulares, seja na membrana citoplasmática ou intracelularmente, e reconhecem produtos de uma grande quantidade de microrganismos diferentes. Existem nove TLR funcionais distintos em humanos, denominados de TLR1 a TLR9, os quais são glicoproteínas do tipo I integrais de membrana. TLRs possuem domínio de homologia *Toll*/receptor de IL-1 (TIR) em suas caudas citoplasmáticas, essenciais à sinalização. Diferentes intermediários adaptadores e sinalizadores são utilizados por diversos TLR para

intermediar os sinais intracelulares como, por exemplo, o MyD88, os quais induzem a ativação do NF- $\kappa$ B, que está presente na via de sinalização de todos os TLRs, exceto o TLR3 (UNDERHILL et al., 1999; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; KLEINNIJENHUIS et al., 2011).

O MTB expressa múltiplos agonistas para TLR, os quais são os principais receptores envolvidos no reconhecimento de antígenos do bacilo e responsáveis pela ativação de macrófagos e células dendríticas (MOUTINHO, 2011). Os TLR do tipo 2 (TLR2) têm sido extremamente associados ao reconhecimento dos antígenos micobacterianos e à modulação das funções de fagócitos e indução da imunidade adquirida, bem como MyD88 e IL-1 que estão associados à ativação de fagócitos (COOPER, 2008). Como exemplo, pode-se citar o estímulo da expressão de moléculas coestimuladoras, como o CD80 e CD86, na superfície de macrófagos e de células dendríticas que são capazes de interagir com os receptores CD28 dos linfócitos T, proporcionando a interação entre a resposta imune inata e a adaptativa e, portanto, promovendo a ampliação da resposta imune (MOUTINHO, 2011).

### 2.3.3 Imunidade inata

A resposta imune inata contra o MTB é extremamente essencial para defesa do organismo contra a infecção primária ou reativação pós-primária, porém ela é insuficiente para o controle da infecção por um longo prazo e prevenção do desenvolvimento da tuberculose ativa. As principais funções da imunidade inata são regular a reação inflamatória e aperfeiçoar o desenvolvimento e manutenção da resposta imune adaptativa, principalmente aquela desencadeada pelos linfócitos T (PHILIPS; ERNST, 2012).

A imunidade inata, na ausência de uma exposição prévia ao MTB, inicia-se com a fagocitose e subsequente secreção de Interleucina 12 (IL-12). Juntamente a esses, outros componentes da resposta imune inata podem ser citados, como *Nramp* (*Natural resistance associated macrophage protein*), neutrófilos, células *Natural Killer* (NK), vitamina D, entre outros (RAJA, 2004; O’GARRA et al., 2013).

O *Nramp* é essencial para o transporte de nitrito (NO) do espaço intracelular para os fagolisossomos, onde poderá ser convertido para óxido nítrico, um importante bactericida (PHILIPS; ERNST, 2012).

Os neutrófilos são rapidamente recrutados para os sítios de infecção e, assim como os macrófagos, fagocitam os bacilos e possuem atividades antimicobacterianas. Nas primeiras horas da infecção, os neutrófilos podem eliminar os bacilos efetivamente, porém existe a possibilidade de disseminação do bacilo viável. Se a infecção não é resolvida, a interação de neutrófilos com fagócitos mononucleares, bem como a influência da resposta mediada por células T, pode determinar a clínica e o desfecho imunológico da infecção. Em infecções bem estabelecidas e/ou doenças avançadas, um elevado número de neutrófilos é encontrado. Acredita-se que, nessas situações, os neutrófilos podem contribuir com o desenvolvimento da doença, mas também podem representar um mecanismo compensatório diante da replicação não controlada dos bacilos (EUM et al., 2010; LOWE et al., 2012).

As células NK também são células efetoras da imunidade inata. Macrófagos infectados pelo MTB superexpressam vimentina, molécula pela qual as células NK se ligam através dos receptores NKp46 e conseguem lisar os macrófagos infectados. Essas células ainda podem lisar diretamente os patógenos. Durante a infecção recente, as células NK ainda são capazes de ativar as células fagocíticas nos sítios da infecção, principalmente por produzirem INF- $\gamma$  sob estímulo da IL-12. A redução significativa da atividade de NK está associada com tuberculose resistente a múltiplos fármacos (TB-MDR) (RAJA, 2004; COOPER, 2009; PHILIPS; ERNST, 2012).

As células *Natural Killer* T variante (NKT) são ativadas durante a infecção pelo MTB e reconhecem os lipídeos bacterianos ligados a moléculas apresentadoras de antígenos do tipo CD1d. Em resposta a esta ligação, as células NKT secretam citocinas e modulam a ativação de células NK, linfócitos B e T, assim como macrófagos e células dendríticas (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011; PHILIPS; ERNST, 2012).

A vitamina D também atua na resposta imune inata e contribui para o controle da TB, reduzindo o crescimento das células bacterianas dentro do macrófago (COOPER, 2009; PHILIPS; ERNST, 2012).

#### **2.3.4. Resposta imune adquirida**

A imunidade adquirida desencadeada na TB caracteriza-se pela resposta mediada por células TCD4+ antígeno-específicas que



reconhecem antígenos ligados ao MHC de classe II, e ocorre de uma maneira muito mais lenta quando comparada a outras doenças. Isso se explica pela lentidão da migração das células dendríticas infectadas pelo MTB até os linfonodos, onde são reconhecidas pelas células T *naive* antígeno-específicas. O atraso do desenvolvimento de uma resposta protetora especializada permite a proliferação dos bacilos no local da infecção e a indução da inflamação. A modulação do microambiente pelos bacilos ativos em fase de crescimento, tanto no local da infecção quanto nos sítios de ativação das células T, provavelmente também constituem um papel importante na indução e expressão lenta da imunidade (KAUFMANN, 2001; COOPER, 2009; TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011; PHILIPS; ERNST, 2012).

Diversos subtipos de linfócitos TCD4<sup>+</sup> são importantes no desenvolvimento da imunidade contra TB, principalmente as células T diferenciadas no seu subtipo 1, as Th1, através da indução por IL-12 produzida predominantemente por células apresentadoras de antígeno ativadas. Os linfócitos Th1, ao exercerem seu papel na resposta imune, secretam principalmente INF- $\gamma$  aproximadamente 20 dias após a infecção, o qual se acumulará nos pulmões. Os linfócitos Th1 também secretam IL-2, TNF e outras linfocinas, que auxiliam no desenvolvimento da resposta imune especializada (CAMPOS, 2006; MOUTINHO, 2011; PHILIPS; ERNST, 2012).

Os MTB, após infectarem os macrófagos pulmonares, inibem a maturação dos fagossomas e a fusão com os lisossomas, escapando do sistema imune. Porém há secreção de antígenos do bacilo em vesículas apoptóticas, associados ao MHC de classe I, que também estimulam os linfócitos T CD8<sup>+</sup> através do evento denominado apresentação cruzada (PHILIPS; ERNST, 2012). Ao se ativarem, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também secretam citocinas, como INF- $\gamma$  e, além disso, possuem a capacidade de lisarem APCs infectadas pelo MTB através de grânulos enzimáticos ricos em granulinas que ativam outras enzimas. Essas enzimas, por sua vez, degradam lipídeos e desencadeiam a lise celular por apoptose (RAJA, 2004; MOUTINHO, 2011).

O INF- $\gamma$ , embora seja produzido principalmente pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, também é secretado em quantidades menores por linfócitos T CD8<sup>+</sup> e por células de resposta imune inata, como as APC. Mesmo sendo insuficiente para eliminar a infecção, o INF- $\gamma$  é a citocina-chave para ativação de macrófagos e, portanto, para o controle da infecção. Na ausência do INF- $\gamma$  ou de sua sinalização, o ser humano torna-se mais susceptível ao MTB (RAJA, 2004; MOUTINHO, 2011). Além disso, o

INF- $\gamma$  induz a expressão de MHC de classe II pelos macrófagos e age nas células não hematopoiéticas para regular a inflamação mediada por IL-17 no local da infecção (PHILIPS; ERNST, 2012).

Juntamente com INF- $\gamma$ , a Interleucina-17 (IL-17) também é produzida no início da infecção, em grande parte pelos linfócitos T do tipo 17 (Th17), e tem a capacidade de induzir a expressão de quimiocinas que promovem o recrutamento celular para a formação do granuloma. Durante a fase crônica da infecção, o balanço entre a resposta induzida por Th1 e Th17 é necessário, pois, a expressão intensa de IL-17 pode levar ao recrutamento e acúmulo de uma grande quantidade de neutrófilos nos pulmões e, conseqüentemente, causar danos ao hospedeiro devido ao desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada (TORRADO; COOPER, 2010; O'GARRA et al., 2013).

Os linfócitos T CD8+ também desempenham importante papel na regulação do balanço de linfócitos Th1 e linfócitos T do tipo 2 (Th2) nos pulmões de pacientes com TB ativa, muito importante para o estabelecimento da resposta imune. Isso porque linfócitos Th2 produzem citocinas, como IL-4 e IL-10, supressoras da atividade de Th1, favorecendo o desenvolvimento da TB para uma fase avançada (RAJA, 2004; CAMPOS, 2006; MOUTINHO, 2011; PHILIPS; ERNST, 2012).

Derivados do MTB não peptídicos, biometabólitos fosforilados, como a isopentanolpirofosfato (IPP), são considerados os principais antígenos reconhecidos pelos receptores dos linfócitos T  $\gamma\delta$ . Porém, os linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados por fosfoantígenos possuem pequena diversidade de receptores celulares, e apenas uma pequena porção é capaz de induzir imunidade protetora contra TB. Por outro lado, linfócitos T  $\gamma\delta$  ativados por antígenos proteicos derivados do MTB são capazes de induzir, de maneira efetiva, tanto a resposta imune inata, quanto a adaptativa. Existem ainda evidências de que os linfócitos  $\gamma\delta$  participam da resposta imune contra TB desenvolvida por outras células do sistema imune. Sendo assim, também desempenham importante papel no controle da infecção, porém ainda poucos antígenos micobacterianos são conhecidos como ativadores de linfócitos T  $\gamma\delta$  (XI et al., 2013). Em adição, estudos indicam que a participação desses linfócitos no combate ao MTB tem maior efeito na resposta imune inicial e na infecção latente (RAJA, 2004).

O número de células T efectoras antígeno-específicas permanece relativamente estável na fase latente da infecção. Portanto, ou as células T efectoras possuem uma capacidade ilimitada de proliferação, ou o

“pool” das células T efetoras é mantido pelo recrutamento de novas células (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011).

Embora a resposta imune seja extremamente importante para o controle da TB, uma reação intensa e descontrolada pode causar danos no hospedeiro devido a consequências de uma reação imunológica exacerbada. Dessa forma, é necessário um balanço entre a resposta efetora e uma resposta regulatória. Os linfócitos T reguladores (Treg) são células TCD4+ que expressam grande quantidade de CD25 e que dependem do fator de transcrição FOXP3 para se desenvolverem. As Treg inibem a produção de INF- $\gamma$  pelas células T através da expressão de IL-10. Estudos sobre o papel exato da Treg no desenvolvimento da TB são controversos. Enquanto uma linha de raciocínio defende a influência positiva dessas células no desenvolvimento do bacilo por encontrarem grande quantidade de Treg em TB ativa, em contraste, outros estudos afirmam que não há elevação de Treg nos pacientes com TB e, portanto, não facilitam a ocorrência da TB (MOUTINHO, 2011; LIM et al., 2013).

A habilidade da resposta imune adquirida de limitar o crescimento bacteriano é a chave para a sobrevivência à infecção pelo MTB, porém a insuficiência dessa imunidade para eliminar a bactéria sugere que há falhas importantes na resposta. Como exemplo de falhas, pode-se citar a incapacidade dos fagócitos de eliminar a bactéria independentemente do seu estado ativado e a habilidade desenvolvida pelas bactérias para inibir a ativação dos macrófagos (COOPER, 2009; O’GARRA et al., 2013).

## 2.4 IMUNOLOGIA DA COINFEÇÃO HIV/M. TUBERCULOSIS

A infecção pelo HIV caracteriza-se por uma invasão das células do hospedeiro e incorporação ao DNA celular, principalmente dos linfócitos T auxiliares, mas também dos macrófagos, das células dendríticas, entre outras. Essa invasão ocorre pela ligação com receptores, as moléculas CD4+, e com co-receptores, moléculas CCR5 e CXCR4 (SANTOS, BECK, 2009). A invasão celular caracteriza-se por replicação viral e destruição das células infectadas e/ou comprometimento da função celular que, por apresentarem papel importante na resposta imune mediada por células, tornam o hospedeiro imunodeficiente (MUNAWWAR, SINGH, 2012). Um indivíduo considerado imunocompetente possui de 800 a 1000 linfócitos T

CD4+/mm<sup>3</sup>, enquanto que um infectado pelo HIV tem um importante declínio desse valor que, quando menor do que 350 células/mm<sup>3</sup>, considera-se que o indivíduo desenvolveu a aids (BRASIL, 2004; CAMPOS, 2006), e quando menor do que 200 células/mm<sup>3</sup>, caracteriza-se também por severa diminuição celular e a fase mais avançada da infecção (SANTOS; BECK, 2009). Portanto, o portador de HIV torna-se bem mais susceptível ao desenvolvimento de muitas doenças infecciosas, como a TB. Indivíduos portadores de HIV têm 8% a 10% de chance por ano de desenvolver a TB a partir de uma infecção prévia pelo bacilo, enquanto que naqueles imunocompetentes, esta chance é de 10% durante toda a sua vida (RAJA, 2004; SILVA; ROSA; LEMOS, 2006). A infecção pelo HIV é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da TB ativa, com a forma extrapulmonar da doença frequentemente presente (CHEN et al., 2011; MOUTINHO, 2011). Diante deste quadro, pode-se afirmar que a resposta imune envolvida na coinfeção é diferente daquela anteriormente mencionada para indivíduos somente portadores do MTB.

Como os receptores CD4+ dos linfócitos T estão ligados ao HIV pelo antígeno gp120, a interação dessas células com as células apresentadoras de antígeno pelo complexo MHC de classe II fica prejudicada, o que resulta em uma hiporresponsividade aos antígenos micobacterianos. (BONECINI-ALMEIDA et al., 1999; NICOD, 2007). Em pacientes coinfectados pelo MTB/HIV, a expressão de INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 pelos linfócitos T CD4+ é suprimida (RAJA, 2004). A presença de INF- $\gamma$  nos pulmões desses pacientes portadores da coinfeção HIV/MTB se deve a produção da mesma pelas células TCD8+, os linfócitos T citotóxicos, que estão presentes em maior quantidade nos pulmões de pessoas soropositivas ao HIV, quando comparadas aos indivíduos soronegativos. Porém, ela não é suficiente para resolver a infecção e, portanto, a supressão dos linfócitos TCD4+, principalmente os do tipo Th1, pode explicar a grande susceptibilidade a muitas infecções intracelulares (RAJA, 2004; BECK, 2005; SUTHERLAND et al., 2010).

Os monócitos alveolares, que desempenham papel fundamental na morte do bacilo e produção de citocinas pró-inflamatórias, ao se infectarem pelo vírus do HIV, não somente têm a sua função alterada, como também são induzidos à morte pela ação viral. Como consequência, há o crescente desenvolvimento do bacilo, devido à incapacidade do organismo de contê-lo, e à chance da infecção se tornar

uma doença ativa aumenta (BAUER et al., 2008; DIEDRICH; FLYNN, 2011; MOUTINHO, 2011)

A formação do granuloma também é fortemente afetada pela coinfeção. A alteração da resposta imune pelo HIV influencia na deficiência da formação, da manutenção e da composição do granuloma. O granuloma de indivíduos soropositivos ao HIV possui menos linfócitos e macrófagos epiteliais, uma organização celular pobre e maiores áreas de necrose se comparado com o granuloma desenvolvido em pacientes soronegativos ao HIV. Além disso, a quantidade encontrada de BAAR dentro do granuloma dos coinfectados é maior. Isso contrasta com a baixa frequência de escarros positivos observados em pacientes com a coinfeção, fato que sugere que a micobactéria ocupa um nicho celular ou tecidual distinto em pacientes portadores de HIV (PHILIPS; ERNST, 2012).

A gravidade da coinfeção tem sido extensivamente examinada em estudos clínicos. A extrapolação de evidência periférica para os acontecimentos pulmonares tem aumentado a compreensão de como o HIV contribui para a maior susceptibilidade ao desenvolvimento da TB. No entanto, o estudo desses eventos diretamente nos pulmões é escasso e se faz necessário para uma melhor compreensão dos eventos imunológicos que envolvam a coinfeção (DIEDRICH; FLYNN, 2011).

### 3 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) existe há aproximadamente 15.000 anos e a sua detecção em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem 3.400 anos antes de Cristo (CAMPOS, 2006). A tuberculose, que é a doença desenvolvida pela infecção por MTB (LOBUE; ENARSON; THOEN, 2010), caracteriza-se como uma doença infectocontagiosa da antiguidade, com relatos e registros na pré-história (DANIEL, 2006). Porém, embora muito antiga a TB ainda é uma doença presente na atualidade e é considerada um problema de saúde pública mundial, pois, atinge milhões de indivíduos e causa a morte de milhares de pessoas anualmente (WHO, 2013). O melhor entendimento da doença com relação à sua patogenicidade e à resposta imunológica do hospedeiro desde o início da infecção e também durante todo o desenvolvimento do MTB até o estabelecimento da TB é fundamental para o a criação de novas vacinas e para o desenvolvimento de novos fármacos antituberculose (COOPER, 2009; ERNST, 2012). Muitos estudos já foram realizados a esse respeito, porém vários aspectos da doença ainda permanecem pouco ou totalmente desconhecidos (BOLD; ERNST, 2009; COOPER, 2009; BLOMGRAN et al., 2012; ERNST, 2012; KERKHOFF et al., 2013; XI et al., 2013). Entre esses aspectos, um dos mais intrigante é que, apesar de exposições repetidas, alguns indivíduos permanecem sem a doença, enquanto que outros apresentam as manifestações clínicas da TB. Outro aspecto interessante é a resposta à vacina BCG que mostra grande variação de indivíduo para indivíduo e de região para região (MUNAWWAR; SINGH, 2012). Por outro lado, estudos efetuados até este momento indicam que a resposta imune do tipo celular desempenha um papel fundamental no combate ao desenvolvimento do agente etiológico da TB no organismo infectado (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011). Esse papel pode ser comprovado pelo fato de que indivíduos coinfectados pelo MTB e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o qual causa severa diminuição na quantidade de células T auxiliares (TCD4+), possuem maior facilidade no desenvolvimento da doença ativa e de suas formas mais graves quando comparados a indivíduos não portadores do HIV e imunocompetentes (KWAN; ERNS, 2011; MUNAWWAR; SINGH, 2012). Portanto, uma melhor compreensão da resposta imune celular é

fundamental para o entendimento da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias no combate ao MTB.

As amostras de escarro espontâneo compreendem o material mais utilizado para os exames laboratoriais e para o diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa, pois, além de possuírem os bacilos, também possuem macrófagos alveolares e polimorfonucleares, os quais são os tipos celulares envolvidos na resposta imune e, portanto, são de grande interesse para as investigações científicas (BRASIL, 2008). A análise das células de escarro por microscopia óptica é um método bem estabelecido para a determinação das subpopulações leucocitárias pela morfologia celular (PIZZICHINI et al., 1996; BELDA et al., 2000) e já está padronizado em nosso laboratório (SILVA et al., 2010). Porém a técnica de microscopia possui algumas limitações, como a variabilidade intraobservador, baixa reprodutibilidade e avaliação e contagem de uma pequena quantidade de células (400 células) (PIZZICHINI et al., 1996). Além disso, a baixa qualidade da amostra, com grande quantidade de saliva e presença de numerosas células epiteliais e restos celulares podem induzir um erro diagnóstico (BAZZO et al., 2004; VIDAL et al., 2012; BROOKS et al., 2013). Pela microscopia também não é possível o estudo de subpopulações leucocitárias, como a diferenciação de linfócitos T citotóxicos dos linfócitos T auxiliares, os quais possuem características morfológicas muito semelhantes e, portanto, indistinguíveis morfológicamente. Essa discriminação dos linfócitos em seus subtipos possui grande importância, pois, desempenha funções significativamente distintas no sistema imune celular.

Pela citometria de fluxo é possível fazer a diferenciação dos subtipos leucocitários através da detecção de partículas presentes nas superfícies celulares, denominadas *Cluster of Differentiation* (CD), por anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Essa metodologia de análise celular permite também a avaliação de diversos parâmetros em milhares de células por amostra, além de possibilitar a exclusão das células escamosas e restos celulares da avaliação leucocitária (BROOKS et al., 2013)

Estudos por citometria de fluxo, comparando as subpopulações leucocitárias de escarro de indivíduos saudáveis com a de portadores de asma revelam diferenças significativas entre os dois grupos, o que contribuí para uma melhor compreensão da doença e eficácia de tratamento (LOURENÇO et al., 2009; VIDAL et al., 2012; STAPLES et al., 2012). Dessa forma, embora alguns trabalhos utilizem a citometria de fluxo para avaliação de células no escarro de pacientes portadores de

tuberculose pulmonar ativa, a metodologia ainda não está bem definida, pois, o bacilo da TB presente nas amostras de escarro, pode contaminar o manipulador e o citômetro de fluxo durante o processamento do material. Portanto, para a realização de uma técnica segura, é necessária a morte do bacilo sem afetar a viabilidade e a integridade da membrana leucocitária exigidas para a realização da citometria de fluxo.

Assim, este trabalho teve como objetivo padronizar a avaliação dos leucócitos em escarro de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos por citometria de fluxo e de investigar a importância deste método no estudo da resposta imune celular desenvolvida pelo organismo infectado pelo MTB.







## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da resposta imune celular em indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos soronegativos ou soropositivos ao HIV por meio da citometria de fluxo.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia da Citometria de Fluxo para a avaliação do fenótipo das células presentes no escarro de pacientes com TB;
- Aplicar a metodologia padronizada na investigação da celularidade do escarro;
- Associar os valores encontrados dos subtipos leucocitários entre indivíduos com TB pulmonar ativa e bacilíferos, soronegativos ou soropositivos ao HIV;
- Caracterização da população estudada com relação as variáveis;



## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo, realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM), foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o n° 315.502 emitido em 08/07/2013 (ANEXO I).

### **5.2 AMOSTRAS**

#### **5.2.1 Amostras de escarro espontâneo**

Foram obtidas 34 amostras de escarro espontâneo de pacientes atendidos no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) e no Hospital Nereu Ramos, ambos situados em Florianópolis, Santa Catarina, no período de julho de 2013 a janeiro de 2014. Todos os pacientes doadores das amostras preencheram os critérios de inclusão pré-estabelecidos, os quais são: Portadores ou com grande suspeita de portarem tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos (HIV soro-positivos e HIV soro-negativos) com infecção primária, recidivados ou que abandonaram o tratamento há mais de três meses. Em todas as situações, os pacientes deveriam ser virgens de tratamento ou estarem em tratamento com fármacos antituberculosos por no máximo 10 dias no momento da coleta. Todos os pacientes concordaram em ser voluntários após receberem informações sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

#### **5.2.2 Amostras de sangue periférico**

Amostras de sangue periférico (SP) com anticoagulante EDTA foram coletadas de cinco indivíduos hígidos e utilizadas em uma etapa

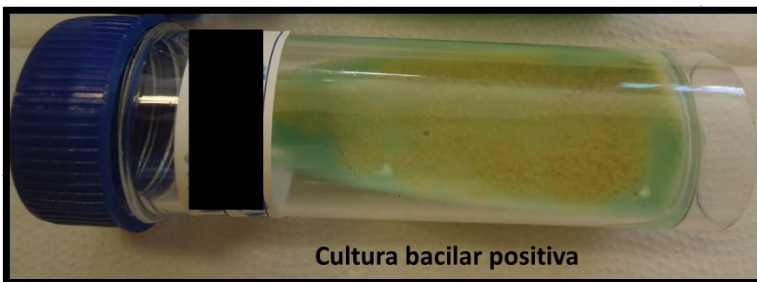
da padronização da análise do escarro por citometria de fluxo. Os voluntários dessa fase também foram orientados quanto ao estudo e assinaram o TCLE (ANEXO III).

### 5.3 CULTURA PARA MICOBACTÉRIAS

Amostras de escarro foram cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial utilizado, o qual continha o meio de cultura acompanhado de solução descontaminante de NaOH 1N (Laborclin<sup>®</sup>, Brasil) e swab estéril. De maneira sucinta, o swab estéril foi mergulhado na porção mais purulenta da amostra e, em seguida, foi depositado no tubo contendo a solução descontaminante por aproximadamente 2 minutos. Após a incubação, realizou-se a semeadura por estiramento no meio de Ogawa-Kudoh com o swab. Os meios cultivados foram armazenados em estufa a 37°C e semanalmente observou-se o crescimento bacilar até a oitava semana de incubação para emissão do resultado (BRASIL, 2008) (Figura 2).

A cultura teve como finalidade a obtenção de colônias isoladas de micobactérias para posterior identificação das espécies por biologia molecular, descrita no item 5.5.

Figura 2 - Imagem representativa do crescimento bacilar em cultura



## 5.4 PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DE ESCARRO POR CITOMETRIA DE FLUXO

### 5.4.1 Obtenção de leucócitos do escarro

Para a análise de leucócitos do escarro é de extrema importância ressaltar que todas as amostras foram processadas em, no máximo, duas horas após a coleta com a finalidade de se assegurar a viabilidade celular necessária para as próximas etapas.

Em uma cabine de segurança biológica (capela de fluxo laminar) foram selecionadas porções do escarro que macroscopicamente apresentavam-se livre de contaminação salivar (aproximadamente 1.000 mg). A fração de interesse foi colocada em um tubo Falcon de 15 mL e tratada com quatro vezes o seu volume de ditiotreitól (DTT), um agente mucolítico, a 0,1% (*Sputalysin 10%*; CalbiochemCorp, San Diego, CA), de acordo com modificações realizadas no método de Efthimiadis e cols. (1994). A mistura foi incubada por 15 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação, por inversão manual. Após essa etapa, os tubos ficaram em repouso por 10 minutos para baixar os possíveis aerossóis contaminados pelo bacilo do MTB gerados pela agitação. Em seguida, para sustar o efeito do DTT sobre a suspensão de células, foi adicionada solução salina tamponada em fosfato (PBS), pH 7.2+/- 0.1 também em quantidade correspondente a quatro vezes o volume inicial de escarro selecionado. A suspensão resultante foi homogeneizada 10 vezes por inversão e, em seguida, foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após essa última incubação, a suspensão foi filtrada duas vezes em um filtro de náilon com microporos de 48µm (*BBS Thompson*, Scarborough, Ontario) para remover restos celulares e o muco não dissolvido. O filtrado foi centrifugado (300g, 10 minutos) e o pellet de células ressuspenso com 5 mL de PBS e homogeneizado com uma pipeta Pasteur. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e, em seguida, o pellet foi ressuspenso com paraformaldeído 0,5% (v/v em PBS) (MERCK, Hosenbrunn, Bavaria, Germany) e incubado por 40 minutos a temperatura ambiente.

A incubação com o paraformaldeído tem por finalidade inativar os bacilos da *M. tuberculosis*, como demonstrado por Moore e cols. (1999). A inativação dos bacilos é necessária por questão de biossegurança já que os próximos passos foram realizados fora da

Capela de Fluxo Laminar. A técnica proposta por Morre e cols. (1999) foi validada no laboratório em que ocorreu o estudo. Para a validação, bacilos de *M.tuberculosis* H37Rv (1McFarland) foram tratados com paraformaldeídoa 0,5% v/v em PBS e 1,0% v/v em PBS e incubados por 40 e 30 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. Após a incubação, as bactérias tratadas foram cultivadas em meio de cultura *Ogawa-Kudoh* (Laborclin<sup>®</sup>, Pinhais, PA) e o seu crescimento acompanhado visualmente por oito semanas antes da emissão do resultado negativo. Como em ambos os tratamentos não houve crescimento bacilar, optou-se pelo tratamento com paraformaldeído 0,5% v/v em PBS, pois, preferiu-se intervir o menos possível na amostra com adição de reagentes que não fossem PBS.

## 5.4.2 Citometria de Fluxo

### 5.4.2.1 Anticorpos monoclonais

Para a determinação dos valores relativos dos linfócitos T (CD3+) e de suas subpopulações T auxiliar (CD4+), T citotóxico (CD8+), T  $\gamma\delta$  (CD3+ CD4- CD8-) e T  $\alpha\beta$  (CD3+ CD4+ CD8+), dos linfócitos B (CD19+), das células NK (CD16+ CD56+ CD3-), das células NKT (CD16+CD56+ CD3+), dos macrófagos M1 (CD14+ CD80+) e dos macrófagos M2 (CD14+ CD163+) por citometria de fluxo foram utilizados anticorpos monoclonais contra os CDs celulares conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluorocéina (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina cianina 7 (PE-cy7), complexo proteína piridina de clorofila (PerCP), aloficocianina (APC), aloficocianina-cianina 7 (APC-H7), V450 e laranja pacífico (Pacific Orange). As especificações dos anticorpos monoclonais quanto ao clone, fabricante e volume recomendado e utilizado para marcação estão descritas na Tabela 1.



Tabela 1 - Especificações dos anticorpos monoclonais

<b>Anticorpos Monoclonais conjugados com fluorocromos</b>	<b>Clone</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Anti-CD16 FITC</b>	3G8	20	BD
<b>Anti-CD163 PE</b>	GHI/61	20	BD
<b>Anti-CD56 PE-Cy7</b>	NCAM16.2	5	BD
<b>Anti-CD19 PerCP</b>	HIB19	5	BD
<b>Anti-CD14 APC</b>	MφP9	5	BD
<b>Anti-CD80 APC-H7</b>	L307.4	5	BD
<b>Anti-CD3 V450</b>	UCHT1	5	BD
<b>Anti-CD45 Pacific Orange</b>	HI30	5	INVITROGEN
<b>Anti-CD4/CD8/CD3 tritest</b>	SK3/ SK1/ SK7	20	BD
<b>Anti-CD45 APC</b>	HI30	20	BD

Legenda: CD: *Cluster of Differentiation* / FITC: isotiocianato de fluoroceína/ PE: ficoeritrina/ PE-cy7:ficoeritrina cianina/ PerCP: complexo proteína piridina de clorofila/ APC: alofocianina/ APC-H7:alofocianina-cianina 7

#### 5.4.2.2 Processamento das células do escarro isoladas

Para a marcação das células e caracterização dos fenótipos celulares, primeiro foi realizado um tubo denominado “Controle”, o qual é utilizado para verificação da compensação do equipamento, o qual deve apresentar-se negativo para todos os fluorocromos. Esse tubo também é importante para ajustar a quantidade de células da amostra até a obtenção 2000 eventos/segundo na velocidade “high” durante a aquisição no citômetro de fluxo. Dessa forma, se a amostra apresentar-se hiper celular, a mesma foi diluída, e, se estiver hipocelular ela foi centrifugada e suspensa em uma quantidade menor de volume para a sua concentração. Isso é necessário, pois, como se trata de uma reação antígeno-anticorpo, é importante que não haja excesso de antígeno, bem como de anticorpo, para que a reação seja de qualidade. Para a

realização desse tubo, foram pipetados 100  $\mu$ L da suspensão de células obtidas no item 5.4.1 e adicionados 100  $\mu$ L de solução lisante (Optlyse B, BeckmanCoulter, France) para lisar os eritrócitos que eventualmente estiverem presentes na amostra. A mistura foi incubada por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente, adicionou-se 1mL de água MiliQ à suspensão celular com lisante e realizou-se novamente a incubação nas mesmas condições anteriormente descritas. Após a lise, o tubo foi centrifugado por 5 minutos, a 300 g. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi ressuspendido com 500  $\mu$ L de PBS e o tubo foi encaminhado para aquisição.

Após a verificação da compensação do citômetro de fluxo e o ajuste do número de células das amostras pelo tubo “células”, 100  $\mu$ L da suspensão de células de escarro foram incubadas com os anticorpos monoclonais específicos conjugados aos diferentes fluorocromos por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram processados de acordo com que foi descrito acima, a partir da etapa de adição da solução lisante até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

Para a marcação celular foram utilizadas as seguintes combinações de anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos: Tubo1:Anti-CD16FITC/ Anti-CD163PE/ Anti-CD56PE-Cy7/Anti-CD19PerCP/Anti-CD14APC/Anti-CD80APC-H7/Anti-CD3V450/Anti-CD45PacificOrange; Tubo 2:Anti-CD4FITC/Anti-CD8PE/Anti-CD3PerCP(tritest)/Anti-CD45APC. Todos os anticorpos foram pipetados de acordo com a ordem em que foram acima citados.

A aquisição procedeu-se no citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson (BD), San Jose, Ca, USA). Para aquisição das amostras, o citômetro de fluxo foi programado pra adquirir até 50.000 eventos. O *threshold* foi ajustado em 33.000 em FSC para diminuir a quantidade de aquisição de estruturas que não fossem de interesse, como restos celulares, células mortas ou hemácias não lisadas.

#### 5.4.2.3 Controle de Qualidade

A cabibração e compensação do citômetro de fluxo foram realizadas diariamente com a utilização dos reagentes específicos CS&T

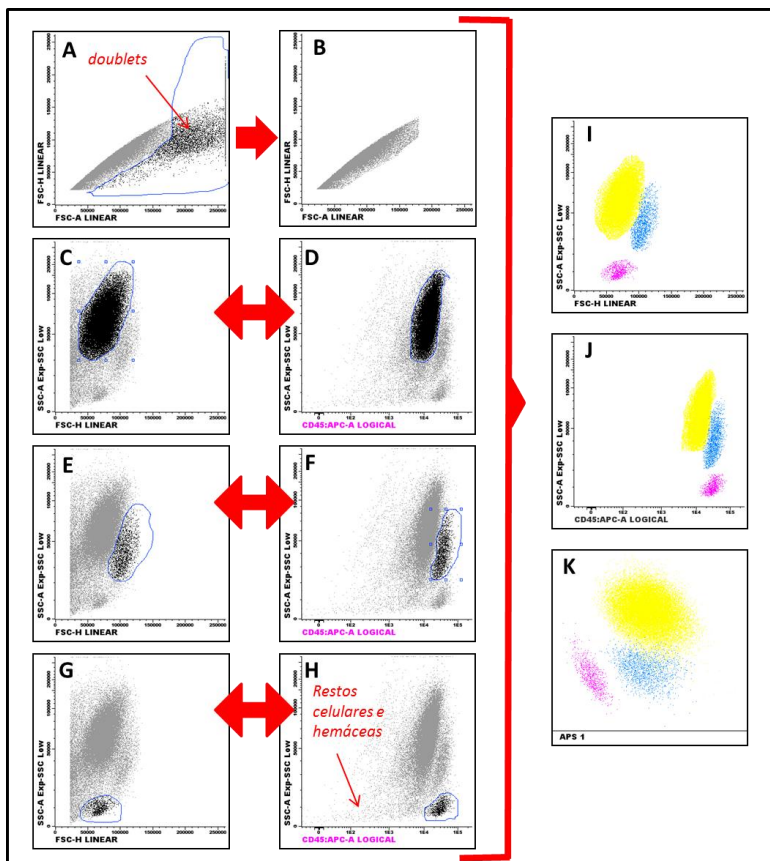
- *Cytometer Setup and Tracking Beads* (BD Biosciences, EUA) e IMMUNO-TROL™ *Cells* (BeckmanCoulter®, Florida, USA). O CS&T é um sistema de partículas que otimiza as voltagens e permite a caracterização automática e emissão de um relatório sobre as medidas do citômetro de fluxo através de um *software*. O IMMUNO-TROL™ é composto por leucócitos estabilizados com uma quantidade conhecida de antígenos de superfície. Sua utilização tem por finalidade verificar o desempenho dos anticorpos monoclonais, bem como verificar o processo de marcação, de lise e de análise das amostras.

### 5.4.3 Análise dos dados pelo software Infinicyt

A análise dos dados obtidos no citometro de fluxo foi feita com o *software* Infinicyt versão 1.7.0 (Cytognos S.L., Espanha). Na análise dos dados, é necessária a eliminação de tudo aquilo que for estruturas diferentes de leucócitos íntegros do total dos 100% de eventos. Em um primeiro passo, os dados foram analisados em um *dot-plot* representando os eventos de acordo com o tamanho celular, identificado pelo detector frontal da dispersão de luz do laser que incide sobre os eventos, denominado “*Foward scatter*” (FSC), para parâmetros altura (H) *versus* área (A) (FSC-H X FSC-A). Essa estratégia tem por finalidade a eliminação dos *doublets*, isto é, células que ficam coladas umas nas outras, provavelmente devido às centrifugações. Em um segundo passo, realizou-se *gates* (janelas) de acordo com granulosidade celular, identificado pelo detector lateral de dispersão de luz do raio laser que incide sobre os eventos, denominado “*Side scatter*” (SSC) *versus* FSC para os neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos. Em um terceiro passo, complementando o *gate* anterior, as populações dos subtipos celulares também foram delimitadas em outro *gate* definido por SSC *versus* positividade para anti-CD45. Este anticorpo monoclonal foi escolhido porque o CD45 é um marcador pan-leucocitário, ou seja, está presente na membrana de todos os leucócitos, porém em uma quantidade diferente entre os subtipos celulares, o que gera intensidades de positividade distintas e, assim, permite a identificação das subpopulações. A combinação desses dois *gates* (SSC X FSC e SSC X Anti-CD45) tem como objetivo delimitar as subpopulações leucocitárias e, com isso, aumentar a pureza das populações celulares com a eliminação do máximo possível de células mortas, restos celulares,

hemácias e outros tipos de células que não correspondem aos leucócitos. Em um quarto passo, as subpopulações foram avaliadas pela observação da distribuição dos eventos em APS (Separador Automático de Células), a qual é um recurso que faz uma separação automática dos eventos em várias dimensões. Pois, o APS é capaz de separar os agregados celulares pelas diferentes combinações de parâmetros, agrupando os eventos com características semelhantes entre si (Figura 3). E, por fim, a partir dos 100% dos leucócitos assim selecionados, as subpopulações leucocitárias de interesse foram determinadas de acordo com a positividade para os marcadores selecionados no estudo descritos acima.

Figura 3 – Representação da estratégia de *gate* utilizada na análise dos resultados da citometria de fluxo



Legenda: A- Seleção da área de *doublets* em FSC-H versus FSC-A; B- *Dot-plot* de FSC-H versus FSC-A após a eliminação dos *doublets*; C- *Gate* de neutrófilos em SSC versus FSC; D- *Gate* de neutrófilos em SSC versus anti-CD45; E- *Gate* de monócitos/macrófagos em SSC versus FSC; F- *Gate* de monócitos/macrófagos em SSC versus anti-CD45; G- *Gate* de linfócitos em SSC versus FSC; H- *Gate* de linfócitos em SSC versus anti-CD45. No *dot-plot* também está indicada a área em que os restos celulares e hemácias ficam localizadas com relação à positividade para o anti-CD45; I e J – *dot-plots* de SSC versus FSC, SSC versus anti-CD45 com as

subpopulações delimitadas pelos *gates* e identificadas pelas cores amarelo para neutrófilos, azul para monócitos/macrófagos e rosa para linfócitos; K- Separação das subpopulações leucocitárias representadas por APS.

#### **5.4.4 Validação da análise das populações leucocitárias por citometria de fluxo**

##### *5.4.4.1 Citometria de Fluxo em sangue periférico*

Cinco amostras de sangue periférico foram submetidas aos mesmos tratamentos (DTT e paraformaldeído) e protocolo de marcação do escarro citados acima com a finalidade de verificar se essas intervenções na amostra provocariam danos celulares, principalmente relacionados a alterações nos marcadores localizados na superfície celular, os quais eram alvos dos anticorpos monoclonais utilizados na análise do fenótipo celular por citometria fluxo. Caso houvesse destruição dos mesmos, as subpopulações leucocitárias poderiam ser subestimadas e invalidaria a análise. Optou-se por utilizar sangue periférico para esses testes por ser um tipo de amostra com celularidade amplamente conhecida (WHO, 2008), que não necessita do uso do DTT para a obtenção das células e com a qual os integrantes do LOEH já tinham experiências prévias de aquisição e análise (RUDOLF-OLIVEIRA, 2013).

Para isso, as amostras de sangue periférico foram divididas em duas partes da mesma amostra: uma parte foi diluída somente com PBS e a outra foi submetida aos mesmos tratamentos e protocolos de marcação das amostras de escarro. Após esses procedimentos, ambas as partes foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com o item 5.4.2.2. Os resultados obtidos nas duas partes das amostras foram comparados quanto aos valores relativos das populações celulares de leucócitos e intensidade média de fluorescência (IMF) de cada marcador celular.

O método estatístico realizado para a comparação desses dois tratamentos foi o Teste t de *Student* pareado por se tratar de dados com distribuição normal e de amostras dependentes (SHEATS; PANKRATZ, 2002).

#### 5.4.4.2 Análise microscópica

Para a validação dos resultados encontrados na análise dos leucócitos do escarro por citometria de fluxo, 20 amostras de escarro foram analisadas concomitantemente por citometria de fluxo e por microscopia óptica, uma técnica já bem estabelecida para diferenciação das células do escarro pelas características morfológicas (PIZZICHINI et al., 1996; BELDA et al., 2000). Devido a limitações da técnica de microscopia óptica, a qual não consegue diferenciar subpopulações linfocitárias, as populações leucocitárias comparadas foram as dos neutrófilos, dos monócitos/macrófagos e dos linfócitos.

Na confecção das lâminas, 50 µL da suspensão de células do escarro foram colocados em recipientes para citocentrífuga *Shandon III* (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) após a realização do protocolo “Obtenção de leucócitos do escarro” descrito acima. A citospina foi confeccionada a 16 g, por 6 minutos e, posteriormente, ficou em repouso a temperatura ambiente para secagem. Depois de seca, a citospina foi corada com o corante de May-Grünwald-Giemsa no corador automatizado SysmexSP1000i<sup>TM</sup> (Sysmex CO). Nesse método, as lâminas são fixadas por imersão em metanol P.A. durante 5-10 minutos. Após a fixação, as lâminas são imersas em solução de corante de May-Grünwald durante três minutos e, em seguida, em solução de May-Grünwald diluída (1:1) por mais três minutos. Por último, as lâminas são imersas durante 15 minutos em solução de corante Giemsa fresca diluída 1:10 e posteriormente são colocadas para secar. Na avaliação das lâminas coradas, 400 células do escarro não escamosas foram consideradas para contagem diferencial dos leucócitos.

A análise de concordância entre os métodos foi realizada pela regressão de Passing-Bablok, o qual estima as diferenças sistêmicas entre os métodos (constante e proporcional), e pelo gráfico de Bland-Altman. A verificação da concordância por coeficiente de correlação não é apropriada para a situação, embora muitas vezes utilizada com essa finalidade de maneira errada, pois, o coeficiente de correlação representa a associação entre as metodologias e não as concordâncias (HIRAKATA, CAMEY, 2009).

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

Para o estudo da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro no combate a infecção pelo MTB, é importante verificar se a espécie de micobactéria infectante pertencente ao CMTB. Isso porque outras espécies de micobactérias, denominadas Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT), também podem infectar os pulmões e desenvolver a micobacteriose pulmonar, uma doença semelhante à TB e indistinguível clinicamente (PRIMM et al., 2004; TORTOLI, 2009; SALEEB; OLIVIER, 2010). Além disso, os métodos clássicos de diagnóstico laboratorial, baciloscopia e cultura, também não são capazes de distinguir os dois grupos, sendo assim a identificação das espécies por biologia molecular se fez necessária.

### 5.5.1 Extração do DNA micobacteriano

A partir de colônias isoladas obtidas pela cultura descrita no item 5.3 foi realizada a extração de DNA conforme metodologia descrita por van Soolingen e cols. (1994). Colônias de *M. tuberculosis* foram transferidas para uma solução de 400 µL de TE 1X (10 mM Tris/1,0 mM EDTA, pH 8,0) e incubadas em banho-maria a 90°C por 30 minutos para inativação. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e os tubos foram incubados *overnight* a 37°C. Após a incubação foi adicionada uma solução de 70 µL de SDS (10%) e 5µL de proteinase K (10 mg/mL). A mistura foi incubada novamente a 65°C por 10 minutos. Em seguida, para a complexação de proteínas e lipídeos, adicionou-se 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL de uma solução de CTAB/NaCl (4,1% NaCl/ 10% CTAB). A mistura foi mais uma vez incubada a 65°C por 10 minutos. Um volume de 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e as fases foram separadas por centrifugação (7250g por 5 minutos). A precipitação do DNA foi realizada a partir da fase aquosa, com 450 µL de isopropanol seguido de resfriamento *overnight* a -20°C. No dia seguinte, realizou-se a centrifugação das amostras a 7250 x g por 15 minutos. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e deixado à temperatura ambiente para secar. Por último, o DNA foi ressuspenso em TE 1X e armazenado a -20°C.



### 5.5.2 Identificação da espécie por PCR seguida de análise de restrição – PRA- *hsp65*

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação de um fragmento de 441pb do gene *hsp65* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram previamente descritos por Telenti e cols. (1993) (Quadro 2). A PCR foi realizada em um volume final de 50µL, contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmoles de cada iniciador, 10% glicerol, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante e 3 µL de DNA. Amplificou-se a PCR em termociclador Eppendorf (Alemanha), modelo *Mastercycle Personal*, com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA). As condições de amplificação foram: 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de 72°C por 7 minutos.

Quadro 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação da espécie por PCR seguida de análise de restrição – PRA-*hsp65*

Tipo de iniciador	Sequência
Senso (Tb11)	5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'
Antissenso (Tb12)	5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT- 3'

O produto da amplificação foi submetido à ação das enzimas de restrição *BstE II* (Promega, EUA) e *Hae III* (Promega, EUA). Para a digestão do fragmento com *BstE II* foram utilizados 20 µL do produto de PCR, 6U da enzima em tampão 1X e incubou-se a 60°C durante 1 hora. Para a digestão com *Hae III*, foram utilizados 20µL do produto de PCR, 6U da enzima em tampão 1X e incubou-se a 37°C durante 1 hora (TELENTI et al., 1993; CHIMARA et al., 2008).

Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 3% por eletroforese de 80 V por 90 minutos, 100 V por 1 hora e 150V por 1 hora. Marcadores de tamanho molecular de 25 pb e 50 pb também foram aplicados no gel para auxiliarem na definição dos tamanhos das bandas geradas. Posteriormente, procedeu-se a coloração com brometo de

etédeo e a visualização em transiluminador sob luz UV de 320 nm (HOEFER-MacroBue UV-20). Fotos dos géis foram tiradas utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT<sup>®</sup> Biosystems). A imagem foi analisada pela comparação dos padrões de bandas obtidos na digestão enzimática com aqueles já existentes no banco de espécies do programa PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>).

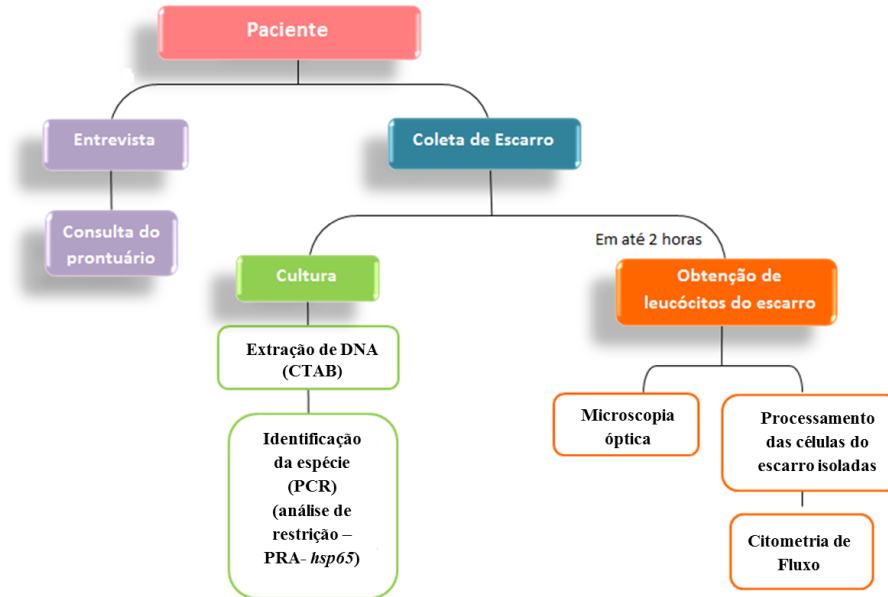
## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, as variáveis numéricas foram sumarizadas como média e desvio padrão, mediana, valor mínimo e valor máximo e as variáveis nominais como percentuais e desvio padrão.

A análise de concordância entre dois métodos analíticos quantitativos foi realizada pela regressão de Passing-Bablok e pelo gráfico de Bland-Altman.

As associações entre os grupos de interesse foram avaliadas pelo teste t de *Student* para variáveis numéricas e Qui quadrado ou teste Exato de Fisher para variáveis nominais em um nível de significância de 5%.

## 5.7 FLUXOGRAMA DO ESTUDO





## **6 RESULTADOS**

### **6.1 PADRONIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA CELULARIDADE DO ESCARRO POR CITOMETRIA DE FLUXO**

#### **6.1.1 Citometria de amostras de sangue periférico**

Nos procedimentos de liquefação do escarro e morte dos bacilos de MTB presentes nas amostras de escarro foram, utilizados os reagentes DTT e paraformaldeído e as amostras foram submetidas a uma série de manipulações. Considerando-se a hipótese de que esses reagentes e as manipulações poderiam interferir na integridade da membrana celular e, conseqüentemente, influenciar na ligação entre os anticorpos monoclonais e as proteínas de membrana, o que inviabilizaria a avaliação da celularidade do escarro por citometria de fluxo, submeteu-se cinco amostras de sangue periférico aos mesmos tratamentos e protocolo de marcação do escarro com o objetivo de verificar se tal interferência ocorreria.

Para a realização dos ensaios, as amostras de sangue periférico foram divididas em duas partes: a primeira parte foi submetida aos mesmos tratamentos e protocolos de marcação das amostras de escarro; a segunda parte foi somente diluída em PBS e marcada com os anticorpos monoclonais. Os resultados das porcentagens e os índices médios de fluorescência (IFM) das subpopulações leucocitárias das duas partes da amostra foram comparados, sendo que a fração da amostra apenas diluída em PBS foi considerada como controle normal das marcações.

Como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, não há diferenças significativas de porcentual e de IMF das subpopulações leucocitárias entre os dois protocolos de tratamento.

Tabela 2 - Comparação da média  $\pm$  DP do percentual das subpopulações leucocitárias em sangue periférico após tratamento com DTT e paraformaldeído ou diluição em PBS

Subpopulações leucocitárias	Marcador celular	Porcentagens celulares (Média $\pm$ DP)		p <sup>*</sup>
		PBS	DTT + Paraf.**	
Neutrófilos	CD45+ CD16+	68,84 $\pm$ 6,62	68,44 $\pm$ 7,14	0,456
Monócitos	CD14+ CD80+	4,42 $\pm$ 0,73	4,45 $\pm$ 0,97	0,870
<i>Natural Killer</i>	CD16+ CD56+	2,73 $\pm$ 0,82	2,70 $\pm$ 0,74	0,736
Linfócitos B	CD19+	2,70 $\pm$ 1,06	2,71 $\pm$ 0,96	0,853
Linfócitos T total	CD3+	19,39 $\pm$ 5,84	19,83 $\pm$ 6,04	0,139
Linfócitos T auxiliares	CD3+ CD4+	11,00 $\pm$ 3,01	11,36 $\pm$ 3,31	0,122
Linfócitos T citotóxicos	CD3+ CD8+	7,32 $\pm$ 3,06	7,29 $\pm$ 3,21	0,896

Linfócitos T gama/delta	CD3+ CD4 - CD8 -	0,89 ± 0,32	0,95 ± 0,36	0,129
Linfócitos T duplo-positivo CD4+ CD8+	CD3+ CD4+ CD8+	0,22 ± 0,20	0,24 ± 0,13	0,419

Legenda: \* Valores de P para Teste t de *Student*; \*\*DTT + Paraformaldeído (0.5% v/v por 40 min).

DP – desvio padrão; DTT – ditiotreitól; Paraf. – paraformaldeído; PBS – tampão fosfato; CD: *Cluster of differentiation*

Tabela 3 - Comparação da média  $\pm$  DP dos índices médios de fluorescência (IMF) das subpopulações leucocitárias em sangue periférico após tratamento com DTT e paraformaldeído ou diluição em PBS

Subpopulações leucocitárias	Marcador celular	IMF (UA) (Média $\pm$ DP)		p*
		PBS	DTT + Paraf.**	
Neutrófilos	CD45+	1.093,40 $\pm$ 156,11	1.094,80 $\pm$ 258,85	0,626
	CD16+	6.0029,60 $\pm$ 1.8227,01	5.9802,00 $\pm$ 1.8081,25	0,114
Monócitos	CD14+	6.5059,40 $\pm$ 5.924,39	6.5112,20 $\pm$ 8.020,10	0,961
	CD80+	6.763,00 $\pm$ 572,53	6.749,80 $\pm$ 793,05	0,918
<i>Natural Killer</i>	CD16+	18.994,00 $\pm$ 7.601,40	19.078,20 $\pm$ 7.494,11	0,779
	CD56+	9.715,60 $\pm$ 3.068,05	9.529,80 $\pm$ 2.968,05	0,275
Linfócito B	CD19+	5.065,40 $\pm$ 509,28	4.998,20 $\pm$ 446,50	0,455
Linfócitos T total	CD3+	2.554,20 $\pm$ 400,21	2.857,00 $\pm$ 437,02	0,171
Linfócitos T auxiliares	CD3+	-----	-----	-----



	CD4+	5.176,40 ± 233,32	5.110,00 ± 298,64	0,271
Linfócitos T citotóxicos	CD3+	-----	-----	-----
	CD8+	1.6768,40 ± 1483,58	1.6761,40 ± 1974,81	0,989
Linfócitos T gama/delta	CD3+	5.056,40 ± 864,19	4.871,40 ± 973,61	0,185
	CD4 -	-----	-----	-----
	CD8 -	-----	-----	-----
Linfócitos T duplo-positivo para CD4 e CD8	CD3+	-----	-----	-----
	CD4+	4.010,80 ± 1210,00	3.856,00 ± 986,42	0,589
	CD8+	7.759,20 ± 3858,36	7.818,60 ± 2062,89	0,964

Legenda: \* Valores de P para Teste t de *Student*. \*\*DTT + Paraformaldeído (0.5% v/v por 40 min)

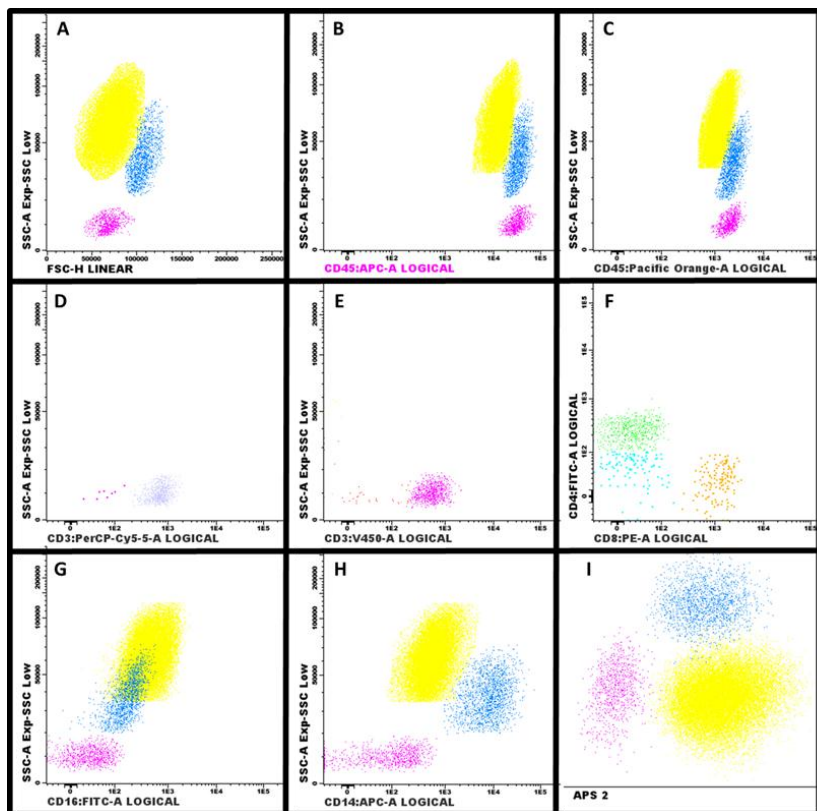
DP – desvio padrão; DTT – ditiotreitól; Paraf. – paraformaldeído; PBS – tampão fosfato; CD: *Cluster of differentiation*;

U.A. – Unidades arbitrárias

### 6.1.2 Imunofenotipagem de leucócitos em amostra de escarro por citometria de fluxo

Após a verificação de que os reagentes e as manipulações descritas nos protocolos não interferiam na membrana celular dos subtipos leucocitários de interesse para o estudo, procedeu-se a marcação das amostras de escarro com os anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos descritos anteriormente. Durante as análises, observou-se que alguns anticorpos não distinguiam as populações positivas das negativas. A possível explicação para este problema seria que, devido à grande discrepância entre a quantidade de células das subpopulações, muitas ligações inespecíficas poderiam estar ocorrendo, prejudicando a análise. Para tentar solucionar este problema, as células do escarro obtidas após o processo de fluidificação e morte dos bacilos foram divididas em três partes antes da marcação celular com os anticorpos monoclonais: uma parte foi marcada de acordo com o item 5.4.2.2 e as outras duas partes da mesma forma, porém o PBS foi substituído por uma solução de 1%, em uma parte, e de 5%, na outra parte, de Albumina de Soro Bovino (BSA) em PBS. Todas as partes da amostra continuaram apresentando os mesmos problemas de marcação celular para os mesmo anticorpos (anti-CD163/PE, anti-CD56/PE-Cy7, Anti-CD19/PerCP, Anti-CD80/APC-H7). Dessa forma, os anticorpos monoclonais conjugados aos seus fluorocromos considerados válidos para imunofenotipagem dos leucócitos isolados de amostras de escarro foram: anti-CD45/APC; anti-CD45/Pacific Blue; anti-CD3/PerCP; anti-CD3/V450; anti-CD8/PE; anti-CD4/FITC; anti-CD16/FITC; anti-CD14/APC. Os *dot-plots* desses marcadores, com a positividade e negatividade para cada subtipo leucocitário podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4 – *Dot plots* representativos da imunofenotipagem de leucócitos em amostras de escarro



Nos *dot-plots* A a E e de G a I as populações estão representadas pelas seguintes cores: neutrófilos em amarelo, monócitos em azul e linfócitos em rosa. No *dot-plot* F, o verde representa a população dos linfócitos T auxiliares (CD4+), o laranja a população dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) e em azul a população dos linfócitos T gama/delta (CD4-CD8).

### 6.1.3 Comparação das subpopulações leucocitárias obtidas pelos métodos de Microscopia Óptica e de Citometria de Fluxo

Com a finalidade de validar o uso da citometria de fluxo para avaliação das subpopulações leucocitárias do escarro, foi avaliada a concordância entre as contagens obtidas por citometria de fluxo e as obtidas por microscopia óptica. Para tanto, verificou-se, paralelamente, a celularidade de 20 amostras de escarro pelas técnicas de microscopia e de citometria de fluxo. Devido às limitações de diferenciação dos leucócitos pela técnica de microscopia óptica, para essa análise foram comparados apenas os percentuais médios dos seguintes subtipos de leucócitos: neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos totais (Tabela 4).

Tabela 4 - Média  $\pm$  DP das porcentagens das subpopulações leucocitárias de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos presentes em amostras de escarro obtidas pelas técnicas de microscopia óptica e de citometria de fluxo

	Neutrófilos (%)	Monócitos/ Macrófagos (%)	Linfócitos totais (%)
Microscopia óptica	92,30 $\pm$ 5,65	6,51 $\pm$ 4,51	1,60 $\pm$ 1,12
Citometria de Fluxo	95,48 $\pm$ 4,00	3,10 $\pm$ 2,33	1,53 $\pm$ 1,53

Na análise de regressão por Passing-Bablok, na qual são consideradas todas as retas possíveis obtidas através de dois pontos experimentais para obter seu estimador. Nessa análise, além da fórmula da regressão, dois valores de interesse também são calculados com seus respectivos intervalos de confiança. A intercepção no eixo A é a medida das diferenças sistemáticas entre os dois métodos. O intervalo de confiança de 95% para a intercepção A pode ser utilizado para testar a hipótese de que A é igual a zero. Esta hipótese é aceita se o intervalo de

confiança para A contenha o valor zero. Se a hipótese é rejeitada, conclui-se que A é significativamente diferente de zero e que ambos os métodos diferem, pelo menos, por um valor constante. O outro valor calculado é o da inclinação B, o qual é a medida das diferenças de proporções entre os dois métodos. O intervalo de confiança de 95% para a inclinação B pode ser utilizado para testar a hipótese de que B é igual a um. Esta hipótese é aceita se o intervalo de confiança para B contenha o valor um. Se a hipótese é rejeitada, conclui-se que B é significativamente diferente de um e que, portanto, há, pelo menos, uma diferença proporcional entre os dois métodos. O Passing-Bablok também é apresentado através de uma representação gráfica (diagrama de dispersão) que contém a linha de regressão (linha contínua), o intervalo de confiança para a linha de regressão (linhas tracejadas) e uma linha de identidade ( $x = y$ , linha pontilhada) (PASSING; BABLOK, 1983; BILIĆ-ZULLE, 2011). Na figura 5 estão descritos os valores de intercepto e de inclinação para cada população, juntamente com a representação gráfica.

Figura 5 - Representação gráfica de *Passing-Bablok*

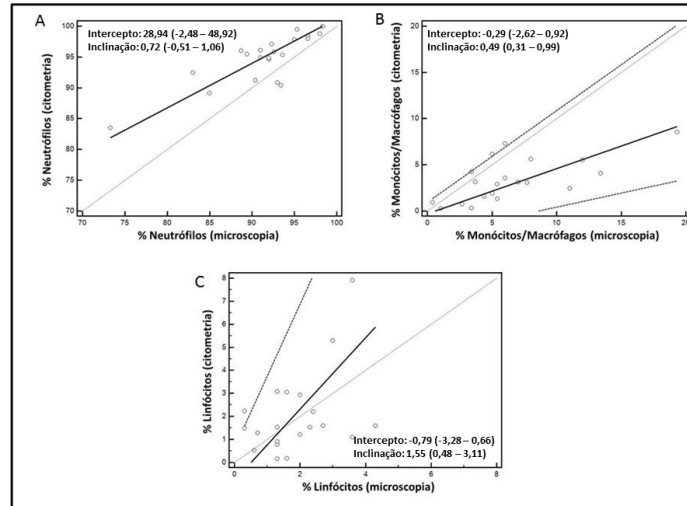


Diagrama de dispersão para comparação das porcentagens das subpopulações leucocitárias de neutrófilos (A), monócitos/macrófagos (B) e linfócitos (C) obtidas pelas técnicas de citometria de fluxo e de microscopia óptica.

Para a verificação da concordância entre as duas metodologias foi realizado o teste de Bland-Altman. Neste teste estatístico, a concordância entre duas variáveis, uma obtida pelo método X e a outra obtida pelo método Y, é verificada a partir de uma visualização gráfica que representa a dispersão entre a diferença das duas variáveis ( $X - Y$ ) e a média das duas  $(X + Y)/2$ . Neste gráfico, é possível visualizar o quanto as diferenças se afastam do valor de zero, denominado como viés, além do erro, que é a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média e tendências (ALTMAN; BLAND, 1983).

A avaliação da concordância dos valores obtidos pelas técnicas de microscopia e de citometria de fluxo mostrou um viés de -3,3% e com limites de concordância de -9,7% a 3,0% para os neutrófilos (Figura 6), um viés de 3,2% e com limites de concordância de -3,6 a 9,9% para os monócitos/macrófagos (Figura 7) e um viés de -0,2% e com limites de concordância de -3,5 a 3,2% para os linfócitos (Figura 8).

Figura 6 - Gráfico de Bland-Altman: comparação entre as porcentagens de neutrófilos obtidos pela metodologia de microscopia óptica e de citometria de fluxo

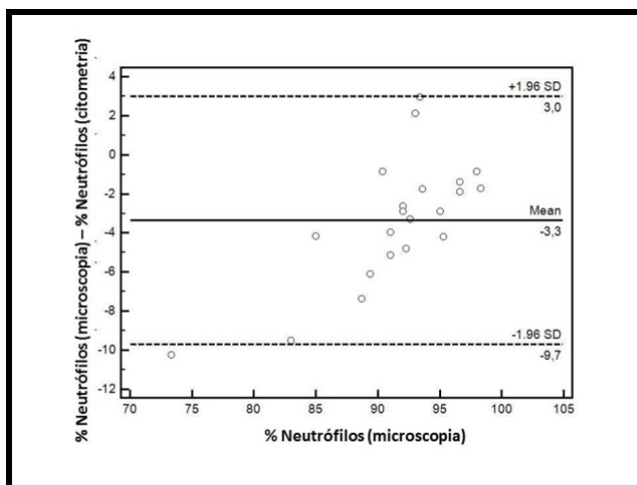


Figura 7 - Gráfico de Bland-Altman: comparação entre as porcentagens de monócitos/macrófagos obtidos pela metodologia de microscopia óptica e de citometria de fluxo.

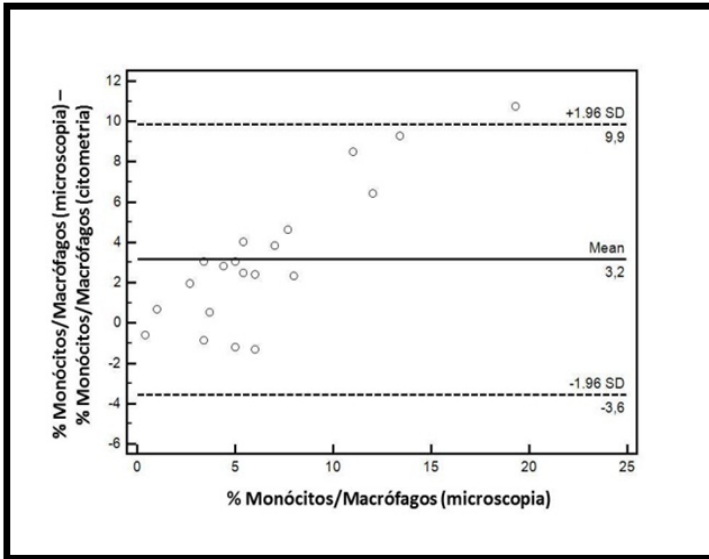
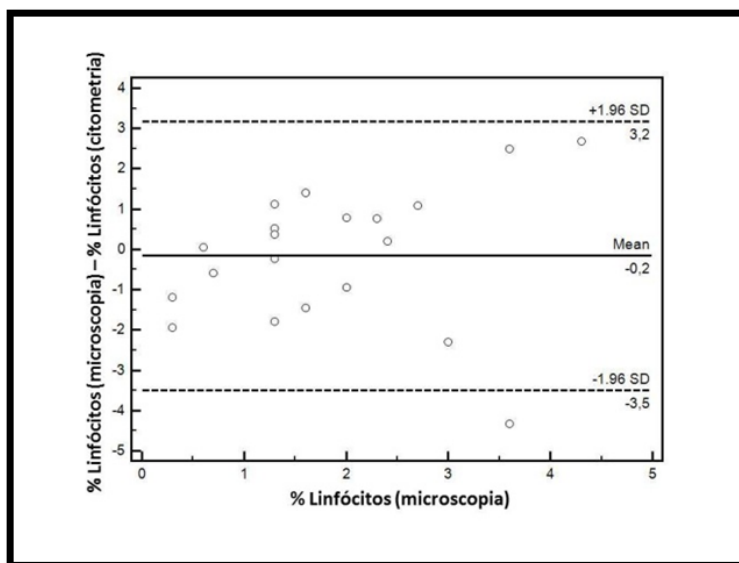




Figura 8 - Gráfico de Bland-Altman: comparação entre as porcentagens de linfócitos obtidos pela metodologia de microscopia óptica e de citometria de fluxo



Como pode ser observado nas Figuras 5, 6, 7 e 8, as análises dos dois testes estatísticos de concordância permitem concluir que a citometria de fluxo é um método confiável para a determinação das porcentagens celulares de neutrófilos e linfócitos. Com relação aos monócitos/macrófagos, embora os testes estatísticos tenham apontado diferenças entre as duas metodologias, particularidades do estudo e da citometria de fluxo, que serão discutidas no item 7.1, permitem considerar estas divergências entre os métodos, porém de uma maneira que não invalida o estudo do imunofenótipo celular.

## 6.2 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

No período de julho de 2013 a janeiro de 2014, do total de 65 pacientes que cumpriam os critérios de inclusão do presente estudo, 35 pacientes não foram incluídos no estudo pelos seguintes motivos: 25

pacientes se recusaram a participar da pesquisa por alegarem não ter mais tosse produtiva, por não estarem com vontade de coletar a amostra ou porque sentiam muita dor no peito ao realizarem a coleta de escarro; três pacientes encontravam-se com um quadro de síndrome de abstinência a álcool e/ou drogas ilícitas e, portanto, estavam totalmente agitados, confusos e sem condições de decisão a respeito da sua participação na pesquisa; três pacientes apresentavam-se inconscientes e quatro pacientes estavam submetidos a respiração mecânica por um tubo endotraqueal e, portanto, impossibilitados de tossir. Desse modo, avaliou-se um total de 30 amostras de escarro provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos.

O diagnóstico laboratorial das amostras por baciloscopia foi realizado em diversos laboratórios da região, de acordo com o protocolo de atendimento do hospital que é: Quando os pacientes são atendidos no HU/UFSC, as amostras são encaminhadas para a Divisão de Análises Clínicas (SACL) da própria instituição. Quando os pacientes são atendidos no Hospital Nereu Ramos, as amostras são encaminhadas para o Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC). Como o Hospital Nereu Ramos é referência para TB na região, muitos pacientes atendidos nesse hospital são provenientes de outros centros de saúde e apresentam diagnósticos de outros laboratórios clínicos.

Segundo o laudo da baciloscopia de escarro dos participantes da pesquisa, os resultados foram classificados como “positivo +” para 26,7% (8/30) das amostras, “positivo ++” para 23,3% (7/30) das amostras e “positivo +++” para 50,0% (15/30) das amostras (Tabela 5).

Dos 30 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, cinco (16,7%) foram atendidos no HU/UFSC e 25 (83,3%) foram atendidos no Hospital Nereu Ramos (Tabela 6). Em relação ao gênero, 13,3% (4 casos) eram do gênero feminino e 86,7% (26 casos) do gênero masculino (Tabela 6). A média de idade dos indivíduos foi de 47,73 anos (Tabela 6), com variação da faixa etária de 18 a 62 anos (mediana de 45 anos). Do total de pacientes, 21 (70,0%) tiveram a infecção pela primeira vez, oito (26,7%) pacientes eram reingressos após abandono de tratamento para TB pulmonar e um caso (3,3%) era de recidiva (Tabela 6). Com relação à presença de coinfeção pelo vírus do HIV, oito pacientes (26,7%) eram soropositivos ao HIV e 22 pacientes (73,3%) eram soronegativos ao HIV (Tabela 6). Vinte e três laudos de radiografia de tórax foram consultados e as alterações radiológicas mais

encontradas foram infiltrado intersticial em 12 casos, infiltrado alveolar em 15 casos e escavações em 13 casos (Tabela 6). Em um mesmo laudo, observou-se somente uma alteração ou, até mesmo, todas as alterações citadas. Quando questionados a respeito de outras comorbidades relacionadas, 33,3% (10/30) dos pacientes relataram ser portadores de outras comorbidades, tais como hipertensão, hepatite do tipo C, anemia, hepatite medicamentosa, depressão, broquite, sífilis, candidíase oral, epilepsia, herpes genital e bronquite (Tabela 6). Embora os pacientes tenham relatado a presença de todas essas comorbidades, somente cinco pacientes (16,7%) alegaram uso contínuo de algum medicamento. As classes de medicamentos relatadas foram a dos anti-hipertensivos e psicotrópicos (Tabela 6).

Tabela 5 - Resultado da baciloscopia das amostras do estudo

Resultado da baciloscopia	Número de amostras (%)
Positivo +	8 (26,7%)
Positivo ++	7 (23,3%)
Positivo +++	25 (50,0%)

Tabela 6 - Número de indivíduos e porcentagens para as variáveis: hospital, gênero, tipo de infecção, sorologia ao HIV, radiografia, comorbidades e uso contínuo de medicamentos

VARIÁVEIS	NÚMERO DE INDIVÍDUOS (%)
<b>HOSPITAL</b>	
HU/UFSC	5/30 (16,7%)
Nereu Ramos	25/30 (83,3)
<b>GÊNERO</b>	
Masculino	26/30 (86,7)
Feminino	4/30 (13,3)

<b>TIPO DE INFECÇÃO</b>	21/30 (70,%)
<b>Primeira</b>	1/30 (3,3%)
<b>Recidiva</b>	8/30 (26,7%)
<b>Reingresso após abandono</b>	
<b>SOROLOGIA AO HIV</b>	
<b>Soro-negativos</b>	22/30 (73,3%)
<b>Soro-positivos</b>	8/30 (26,7%)
<b>RADIOGRAFIA</b>	
<b>Infiltrado intersticial</b>	12/23 (52,2%)
<b>Infiltrado alveolar</b>	15/23 (65,2%)
<b>Escavações</b>	13/23 (56,5%)
<b>COMORBIDADES</b>	
<b>Sim</b>	10/30 (33,3%)
<b>Não</b>	20/30 (66,7%)
<b>USO CONTÍNUO DE MEDICAMENTOS</b>	
<b>Sim</b>	5/30 (16,7%)
<b>Não</b>	25/30 (83,3%)

Legenda: HU/UFSC: Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina

Do total dos oito pacientes portadores da coinfeção MTB/HIV, somente dois (25,0%) afirmaram estar em tratamento regular com antirretrovirais e um relatou já ter realizado o tratamento em algum momento da vida, mas parou o tratamento, pois, o considerou muito complicado. Para a verificação da quantidade de linfócitos T auxiliares desses indivíduos foi realizada a consulta dos laudos de “Resultado de exame de contagem de linfócitos T CD4+/CD8+” no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL). Foram consultados somente os resultados de laudos com datas próximas ao dia da coleta das amostras de escarro. Na análise dos cinco laudos, os valores de linfócitos T auxiliares encontrados foram de  $307 \pm 145,76$  céls/mm<sup>3</sup> para média  $\pm$  DP, de 350,00céls/mm<sup>3</sup> para a mediana e de 59,00 e 443,00 cels/mm<sup>3</sup> para os valores mínimos e máximos, respectivamente (Tabela 7).

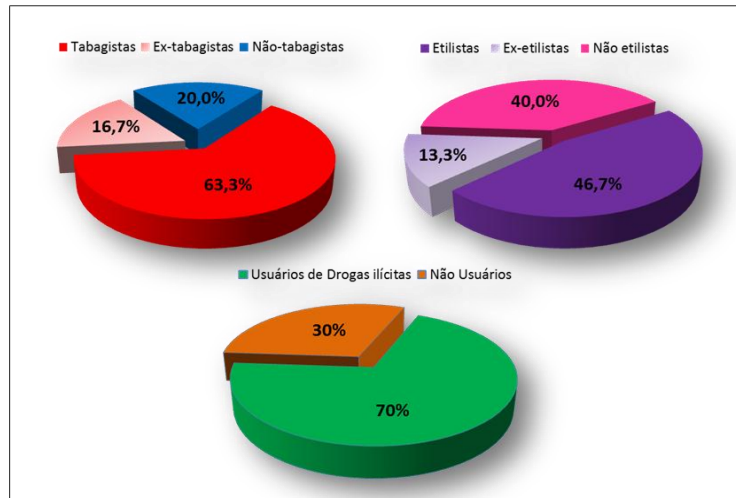
Tabela 7 - Medidas de dispersão dos valores dos linfócitos T auxiliares/mm<sup>3</sup> de sangue periférico dos cinco pacientes portadores da coinfeção MTB/HIV

Medidas de dispersão	Células/mm <sup>3</sup>
Média ± DP	307,00 ± 145,76
Mediana	350,00
Mínimo	59,00
Máximo	443,00

Legenda: DP: Desvio padrão/ mm: milímetro

Na investigação a respeito dos agravos associados à TB, como o tabagismo, o uso de drogas ilícitas e o etilismo, 93,3% (28/30) dos indivíduos apresentaram pelo menos um desses agravos, sendo que o etilismo é o agravo que mais foi encontrado entre os indivíduos, seguido por tabagismo e uso de drogas (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição dos agravos tabagismo, etilismo e uso de drogas ilícitas associadas à tuberculose pulmonar ativa na população estudada



Como pode ser observado na Figura 9, do total de pacientes avaliados, 63,3% (19 casos) dos pacientes eram tabagistas, e, desses 47,4% (9 casos) alegaram fumar menos de um maço de cigarro por dia e 52,7% (10 casos) relataram fumar mais de um maço de cigarro diariamente, com depoimento de até 2 maços e meio de cigarros diários. Os casos de não fumantes corresponderam a 36,7% do total das amostras, sendo que aproximadamente 45% desses indivíduos eram ex-fumantes, os quais foram considerados como tal aqueles que alegaram ter parado de fumar há mais de três meses.

Em relação à dependência química por bebidas alcoólicas, 46,7% (14 casos) dos indivíduos eram etilistas e a cachaça foi a bebida consumida mais relatada entre eles, com depoimento de ingestão de até dois litros da bebida diariamente. Dos 17 pacientes não-etilistas, 41,67% (5 casos) relataram ser ex-etilistas (Figura 9).

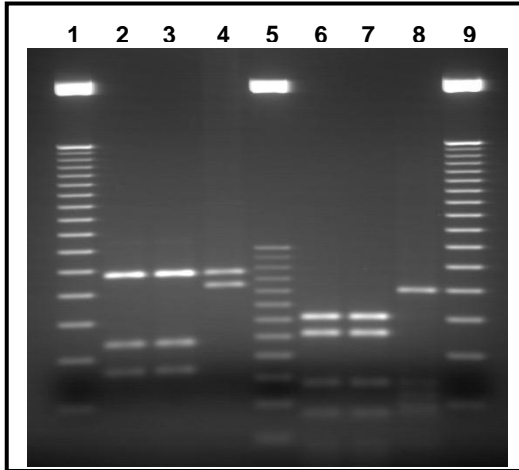
Na investigação quanto ao uso de drogas ilícitas constatou-se que 70% (21) dos pacientes eram usuários de drogas ilícitas, dos quais aproximadamente 90% admitiram ser usuários de crack, cocaína e/ou maconha, e os outros 10% usuários somente de maconha (Figura 9).

### 6.3 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE MICOBACTÉRIA

A caracterização da espécie das micobactérias presentes nas amostras de escarro dos pacientes foi realizada com o objetivo de se confirmar a homogeneidade da população quanto ao patógeno e, dessa forma, tornar possível a investigação das associações das diversas variáveis consideradas no estudo.

Todos os isolados em cultura foram identificados como *M. tuberculosis*. A Figura 10 representa a identificação de um isolado clínico com *M. tuberculosis* pelo método PRA-*hsp65*.

Figura 10 - Gel representativo da identificação da espécie de micobactéria com a utilização do método PRA-*hsp65*



Legenda: Canaleta 1: marcador de peso molecular de 50 pb; canaleta 2: amostra padrão de *M. tuberculosis* H37Rv digerida pela enzima *BstE II*; canaleta 3: amostra de paciente digerida pela enzima *BstE II*; canaleta 4: amostra padrão de *M. abscessus* digerida pela enzima *BstE II*; canaleta 5: marcador de peso molecular de 25 pb; canaleta 6: amostra padrão de *M. tuberculosis* H37Rv digerida pela enzima *Hae III*; canaleta 7: amostra de paciente digerida pela enzima *Hae III*; canaleta 8: amostra padrão de *M. abscessus* digerida pela enzima *Hae III*; canaleta 9: marcador de peso molecular de 50 pb. Os fragmentos de restrição obtidos na amostra padrão de *M. tuberculosis* H37Rv e na amostra de paciente foram *BstE II*: 235-130-85 e *Hae III*: 150-130-70. Na amostra padrão de *M. abscessus*, o padrão obtido foi *BstE II*: 235-210-0 e *Hae III*: 200-70-60. Comparando-se os padrões de bandas obtidos com aqueles já existentes no banco de espécies do programa PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), a amostra padrão de *M. tuberculosis* H37Rv foi confirmada como *M. tuberculosis*, a amostra de paciente foi identificada como *M. tuberculosis* e a amostra padrão de *M. abscessus* foi confirmada como *M. abscessus*.



#### 6.4 ASSOCIAÇÕES DE VARIÁVEIS COM OS TIPOS DE ALTERAÇÕES RADIOLÓGICAS

Não foram observadas associações de variáveis com os tipos de alterações radiológicas (Infiltração Intersticial, Infiltração Alveolar e Cavitações) encontradas nos laudos dos indivíduos. As variáveis estudadas foram: presença de coinfeção MTB/HIV (sim ou não); tipo de infecção de TB (primeira ou recidiva/reingresso após abandono de tratamento), tabagismo (sim e não), etilismo (sim e não), baciloscopia (positivo+, ++ ou +++) (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de p para a associação de variáveis com os tipos de alterações radiológicas

Variáveis	Valor de p*		
	Infiltrado Intersticial	Infiltrado Alveolar	Cavitações
<b>Coinfeção MTB/HIV</b>	0,667	0,657	0,650
<b>Tipo de Infecção de TB</b>	1,000	1,000	0,379
<b>Tabagismo</b>	1,000	1,000	0,650
<b>Uso de drogas ilícitas</b>	0,680	0,400	0,669
<b>Etilismo</b>	1,000	0,667	0,680
<b>Baciloscopia</b>	0,322	0,203	0,346

Legenda:\* Valores de p para variáveis qualitativas obtidas pelo Teste Exato de Fisher

## 6.5 ASSOCIAÇÃO DE VARIÁVEIS ENTRE PACIENTES SORONEGATIVOS E SOROPOSITIVOS AO HIV

As associações das variáveis estudadas com a presença ou ausência de soropositividade ao HIV está descrita na Tabela 9. Não foram observadas diferenças significativas entre pacientes soronegativos e soropositivos ao HIV com relação às variáveis: Gênero, idade, tipo de infecção, tabagismo, classificação de tabagismo, uso de drogas ilícitas e etilismo. Diferenças significativas entre pacientes soronegativos e soropositivos ao HIV foram observadas para as variáveis baciloscopia ( $p = 0,013$ ) e cultura ( $p = 0,047$ ). Uma maior quantidade de bacilos foi observada em amostras de escarro de pacientes soronegativos ao HIV do que em amostras de pacientes soropositivos ao HIV, com o triplo da frequência de resultados de baciloscopia “positiva +++” para as amostras dos pacientes negativos para a coinfeção. Com relação à cultura de escarro, a porcentagem das amostras de pacientes soronegativos ao HIV que positivaram a cultura foi aproximadamente duas vezes maior do que para as amostras de escarro de indivíduos coinfectados.

Tabela 9 - Associação de variáveis entre pacientes soronegativos e soropositivos ao HIV com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos

VARIÁVEIS	Número de indivíduos (Porcentagem)		p*
	HIV SORO-NEGATIVOS	HIV SORO-POSITIVOS	
<b>GÊNERO</b>			1,000
Masculino	19 (86,4%)	7 (87,5%)	
Feminino	3 (13,6%)	1 (12,5%)	
<b>IDADE**</b>	46,45 ± 9,20	36,25 ± 11,61	0,348
<b>TIPO DE INFECÇÃO</b>			0,289
Primeira	15 (68,2%)	6 (75,0%)	

Recidiva	-----	1 (12,50%)	
Reingresso após abandono	7 (31,8%)	1 (12,50%)	
<b>TABAGISMO</b>			1,000
Tabagista	14 (63,6%)	5 (62,5%)	
Não tabagista	4 (18,2%)	2 (25,0%)	
Ex-tabagista	4 (18,2%)	1 (12,5)	
<b>CLASSIFICAÇÃO DE TABAGISMO</b>			0,814
Até 0,99 maço/dia	6 (42,9%)	3 (60,0%)	
Até 1,99 maço/dia	5 (35,7%)	1 (20,0%)	
Mais de 2 maços/dia	3 (21,4%)	1 (20,0%)	
<b>USO DE DROGAS ILÍCITAS</b>			0,523
Sim – cocaína e/ou crack	15 (68,18%)	4 (50,0%)	
Sim - maconha	1 (4,54%)	1 (12,5%)	
Não usuário	6 (27,27%)	3 (37,5%)	
<b>ETILISMO</b>			0,326
Sim	11 (50,0%)	3 (37,5%)	
Não	7 (31,8%)	5 (62,5%)	
Ex-etilista	4 (18,2%)	0 (0,0%)	
<b>BACILOSCOPIA</b>			0,013
Positiva +	3 (13,6%)	5 (62,5%)	
Positiva ++	5 (22,7%)	2 (25,0%)	
Positiva +++	14 (63,6%)	1 (12,5%)	
<b>CULTURA DE ESCARRO</b>			0,047
Positiva	18 (94,7%)	4 (57,1%)	
Negativa	1 (5,3%)	3 (42,9%)	

Legenda:\* Valores de p para variáveis qualitativas obtidas pelo Teste Exato de Fisher e para variáveis quantitativas pelo Test t de *Student*; \*\* Idade representada por média ± DP

## 6.6 CELULARIDADE DAS AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA E BACILÍFEROS

A avaliação dos subtipos leucocitários presentes nas 30 amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos foi analisada por citometria de fluxo. As medidas de dispersões média  $\pm$  DP, mediana, valor mínimo e valor máximo das porcentagens das subpopulações leucocitárias estão descritos na tabela abaixo (Tabela 10).

Tabela 10 - Descrição das médias  $\pm$  DP, medianas e valores mínimos e máximos dos percentuais das subpopulações leucocitárias das amostras de escarro

<b>Subtipos de Leucócitos</b>	<b>Média(%) <math>\pm</math> DP</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Mínimo (%) Máximo (%)</b>
<b>Neutrófilos (CD45+ CD16+)</b>	95,68 $\pm$ 2,97	96,09	89,15 99,61
<b>Monócitos/Macrófagos (CD14+)</b>	2,62 $\pm$ 2,13	2,20	0,0 7,32
<b>Linfócitos Total (CD45<sup>hi</sup>)</b>	1,64 $\pm$ 1,09	1,53	0,17 5,30
<b>Linfócitos T Total (CD3+)</b>	1,59 $\pm$ 1,07	1,49	0,17 5,30
<b>Linfócitos T Auxiliar* (CD3+CD4+)</b>	12,31 $\pm$ 25,85	0,0	0,0 86,23

<b>Linfócito T Citotóxico*</b> <b>(CD3+CD8+)</b>	24,13 ± 20,26	18,12	0,0 86,23
<b>Linfócitos T Gama/Delta*</b> <b>(CD3+CD4-CD8-)</b>	62,85 ± 32,67	78,89	3,92 100,0
<b>Linfócitos T com</b> <b>fenótipo CD4+ e CD8+*</b>	0,02 ± 0,13	0,0	0,0 0,73

Legenda:\* Valores de porcentagem dos subtipos de linfócitos T, considerando o total de Linfócitos T como 100%;  
CD: cluster of *differentiation*/ DP: desvio padrão

## 6.7 ASSOCIAÇÃO DA CELULARIDADE DAS AMOSTRAS DE ESCARRO ENTRE PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA BACILÍFEROS E SORONEGATIVOS OU SOROPOSITIVOS AO HIV

A associação das porcentagens dos subtipos leucocitários determinados pela citometria de fluxo com relação à presença ou ausência da coinfeção MTB/HIV está representada na Tabela 11. Não foram observadas diferenças significativas entre pacientes positivos e negativos para coinfeção com relação aos seguintes subtipos leucocitários: neutrófilos, linfócitos totais, linfócitos T totais, Linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxico, linfócitos T com fenótipo CD4+ e CD8+ e linfócitos T gama/delta. O único subtipo leucocitário que apresentou associação significativa foi o dos monócitos/macrófagos ( $p = 0,035$ ). Pode-se observar que os pacientes HIV soronegativos possuem aproximadamente o dobro da porcentagem de monócitos/macrófagos do que pacientes soropositivos ao HIV.

Tabela 11 - Associação dos subtipos de leucócitos presentes nas amostras de escarros de pacientes com tuberculose pulmonar soropositivos ou soronegativos ao HIV

SUBTIPOS DE LEUCÓCITOS	MÉDIA ± DP		p*
	HIV SORO-NEGATIVOS (8)	HIV SORO-POSITIVOS (22)	
<b>Neutrófilos (CD45+ CD16+)</b>	95,30 ± 3,03	96,72 ± 2,72	0,253
<b>Monócitos/Macrófagos (CD14+)</b>	3,01 ± 2,03	1,55 ± 2,15	0,035
<b>Linfócitos Total</b>	1,66 ± 1,20	1,59 ± 0,77	0,363
<b>Linfócitos T Total (CD3+)</b>	1,60 ± 1,18	1,57 ± 0,79	0,858



<b>Linfócitos T Auxiliares** (CD3+CD4+)</b>	12,86 ± 24,73	10,78 ± 30,49	0,663
<b>Linfócitos T Citotóxicos** (CD3+CD8+)</b>	18,16 ± 11,59	40,56 ± 29,61	0,072
<b>Linfócitos T Gama/Delta** (CD3+CD4-CD8-)</b>	68,01 ± 32,45	48,66 ± 30,79	0,214
<b>Linfócitos T com fenótipo CD4+ e CD8+**</b>	0,03 ± 0,15	0,0 ± 0,0	0,546

\* Valores de p para dados paramétricos foram obtidos pelo teste T de *Student* e para dados não paramétricos pelo teste de Mann-Whitney.

\*\* Valores de porcentagem dos subtipos de linfócitos T, considerando o total de Linfócitos T como 100%;

CD: cluster of *differentiation*/ DP: Desvio Padrão

## 6.8 ASSOCIAÇÃO DA CELULARIDADE DAS AMOSTRAS DE ESCARRO DE PACIENTES NÃO PORTADORES E PORTADORES DA TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA

Os escarros de pacientes não portadores de TB pulmonar foram avaliados como controle da população leucocitária pulmonar de indivíduos sem a doença. A associação das porcentagens dos subtipos leucocitários entre os portadores e não portadores de TB pulmonar e bacilíferos está representada na Tabela 12. Embora nenhuma diferença significativa das frequências leucocitárias nos dois grupos estudados tenha sido observada, pode-se observar uma maior quantidade de monócitos/macrófagos e linfócitos T total na amostra de escarro dos não portadores de TB pulmonar. O inverso foi observado para os linfócitos T gama/delta, os quais estão presentes em maior quantidade no escarro dos pacientes portadores de TB pulmonar quando comparados com as amostras dos não portadores.

Tabela 12 - Associação dos subtipos de leucócitos presentes das amostras de escarros de pacientes portadores e não portadores de tuberculose pulmonar (TB)

SUBTIPOS DE LEUCÓCITOS	MÉDIA ± DP		p*
	Não Portadores de TB pulmonar (4)	Portadores de TB Pulmonar (30)	
<b>Neutrófilos (CD45+ CD16+)</b>	87,23 ± 15,12	95,68 ± 2,97	0,630
<b>Monócitos/Macrófagos (CD14+)</b>	8,95 ± 12,34	2,62 ± 2,13	0,129
<b>Linfócitos Total</b>	3,82 ± 3,78	1,64 ± 1,09	0,713
<b>Linfócitos T Total (CD3+)</b>	3,19 ± 3,09	1,59 ± 1,07	0,798

<b>Linfócitos T Auxiliares** (CD3+CD4+)</b>	16,28 ± 32,55	12,31 ± 25,85	0,779
<b>Linfócitos T Citotóxicos** (CD3+CD8+)</b>	23,64 ± 21,80	24,13 ± 20,26	0,764
<b>Linfócitos T Gama/Delta** (CD3+CD4-CD8-)</b>	35,07 ± 40,91	62,85 ± 32,67	0,134
<b>Linfócitos T com fenótipo CD4+ e CD8+</b>	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,13	0,715

\* Valores de p para dados paramétricos foram obtidos pelo teste T de Student e para dados não paramétricos pelo teste de Mann-Whitney.

\*\* Valores de porcentagem dos subtipos de linfócitos T, considerando o total de Linfócitos T como 100%;

CD: cluster of *differentiation*/ DP: Desvio Padrão

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS PRESENTES NO ESCARRO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A tuberculose é considerada um problema mundial de saúde pública que emergiu com a aids e atinge milhões de pessoas anualmente (WHO, 2013). Torna-se imperativo o aperfeiçoamento do conhecimento dos mecanismos que controlam a resposta imune contra o agente etiológico da TB, o MTB para o desenvolvimento de formas eficientes de tratamento e prevenção da doença, seja por uso de novos imunomoduladores, ou pela obtenção de vacinas mais eficazes. A metodologia de microscopia óptica vem sendo amplamente aplicada nos estudos das células do sistema imune presentes em amostras de escarro (PIZZICHINI et al., 1996; BELDA et al., 2000; SILVA et al., 2010). Entretanto, essa metodologia possui algumas limitações, como a necessidade de um conhecimento prévio extremamente especializado da morfologia para a identificação dos diferentes perfis celulares, pois, muitas vezes, as células apresentam-se morfológicamente alteradas devido ao ambiente inflamatório no qual elas estavam inseridas. A microscopia ainda não permite a identificação de subtipos de leucócitos ou de células ativadas. Além disso, a presença de grande quantidade de células epiteliais e restos celulares e a baixa qualidade das amostras, com pouco volume e intensa contaminação por saliva, podem inviabilizar a análise e comprometer o diagnóstico (BAZZO et al., 2004; VIDAL et al., 2012; BROOKS et al., 2013).

No presente estudo, essas limitações impediram a diferenciação e contagem celular de sete amostras de escarro com baixa qualidade, as quais possuíam pouco volume e, portanto, poucos leucócitos, além de conterem muita saliva e grande quantidade de células epiteliais. A baixa qualidade dessas amostras pode ser explicada pela grande dificuldade dos pacientes em realizar a coleta, os quais ou eram soropositivos ao HIV ou estavam muito debilitados e, portanto, com dificuldades de fazer muito esforço para tossir.

Por isso, para viabilizar a análise de células envolvidas na resposta imune em amostras de escarro de pacientes com TB, deve-se investigar novas metodologias mais eficazes. Portanto, neste trabalho,

padronizamos a citometria de fluxo para estudar as células envolvidas no sistema imune contra TB.

Todas as limitações da microscopia óptica citadas acima não interferiram na qualidade do resultado da análise por citometria de fluxo. Dessa maneira, as sete amostras do estudo impossibilitadas de serem analisadas pela morfologia puderam ser avaliadas quanto ao imunofenótipo dos subtipos leucocitários presentes nas mesmas .

A citometria de fluxo consiste em uma metodologia mais avançada de identificação das subpopulações celulares e que vem sendo amplamente utilizada na patologia clínica. Considera-se que essa metodologia revolucionou a hematologia e a imunologia, tornando-se indispensável e fundamental em laboratórios especializados em diagnósticos avançados e equipados com tecnologias modernas. A aceitação crescente da citometria de fluxo se deve à sua relativa facilidade de utilização, e à sua capacidade única, se comparada com qualquer outra tecnologia, de analisar um grande número de células em poucos segundos em relação a diversos parâmetros (SWERDLOW et al., 2008; VIRGO; GIBBS, 2012; RUDOLF-OLIVEIRA, 2013). Porém, apesar da aplicação dessa metodologia em amostras de sangue periférico e outras amostras biológicas ser amplamente conhecida e padronizada, a caracterização das subpopulações celulares no escarro por citometria de fluxo ainda não está totalmente padronizada, embora haja diversos estudos a respeito encontrados na literatura. Além disso, os estudos tratam de amostras de escarro provenientes de pacientes com asma, com doenças pulmonares obstrutivas crônicas, ou mesmo de indivíduos hígidos, por meio do uso de escarro induzido (LOURENÇO et al., 2009; PUI et al., 2010; von SCHEELE, et al., 2011; STAPLES et al., 2012; VIDAL et al., 2012; ). Estudos com escarro proveniente de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos não foram encontrados até o presente momento. Por esse motivo, achou-se por bem que o primeiro objetivo deste trabalho fosse a padronização e implantação da análise de células do escarro de pacientes com tuberculose. Para tanto, a citometria de fluxo foi utilizada.

Assim, em um primeiro passo, avaliou-se a influência dos reagentes e das manipulações na integridade da membrana celular. Como as células presentes no escarro estão envolvidas por uma matriz mucopolissacarídica, a fluidificação do escarro foi necessária para se obter uma suspensão celular. Para tanto, utilizou-se o agente redutor

DTT, um agente mucolítico que interfere na estabilidade da matriz proteica e promove a liberação das células (EFTHIMIADIS et al., 1997). Outro reagente também utilizado foi o paraformaldeído, o qual teve como função matar os bacilos de MTB. Portanto, diante das atividades do DTT e do paraformaldeído, considerou-se a hipótese de que esses também poderiam interferir na conformação tridimensional das proteínas das membranas celulares, as quais eram os alvos dos anticorpos monoclonais do estudo, e, se alteradas invalidariam a ligação antígeno-anticorpo na amostra. Inicialmente, o efeito desses reagentes foi avaliado em amostras de sangue periférico, pois, essas amostras biológicas são as mais amplamente utilizadas nas análises por citometria de fluxo, além da facilidade de manipulação das células com o mínimo de intervenção possível. Como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, o DTT não alterou a integridade da membrana das células investigadas, pois, os valores das porcentagens e dos IMFs das subpopulações leucocitárias não diferiram de modo estatisticamente significativo nas amostras tratadas com DTT e paraformaldeído em relação àquelas consideradas como controle normal para marcação, ou seja, as que não foram tratadas.

Estudos avaliando a interferência do DTT e do paraformaldeído na superfície das células e, conseqüentemente, nos antígenos celulares, somente foram encontrados de forma separada, isto é, ou o estudo avaliava somente o efeito do DTT ou o do paraformaldeído, mas não em associação, como foi realizado neste trabalho.

Os resultados de trabalhos relacionados com a interferência do tratamento celular com DTT são controversos. Loppow e cols. (2000) demonstraram, em um estudo muito referenciado na literatura, que o DTT provocou aumento na expressão de alguns marcadores de superfície de leucócitos de sangue periférico (CD16, CD56 e HLA-DR) e diminuiu de outros (CD2, CD3, CD4, CD45 e CD8). No entanto, o DTT não alterou a dos marcadores CD14 e CD19. Os autores afirmaram que as interferências celulares foram pequenas e que o DTT não invalidou a comparação entre diferentes amostras quanto à análise imunocitoquímica de marcadores de superfície de linfócitos. Por outro lado, Leckie e cols. (2003), em outro estudo que avaliou a influência do DTT em amostras de escarro, não observaram diferenças na expressão de qualquer um dos marcadores de superfície de células CD4+ e CD8+

testados (CXCR3, CCR5, CCR3, CD69 ou CD103) entre as amostras pré-tratadas com DTT e aquelas tratadas somente com tampão.

Em relação ao paraformaldeído, estudos que mostram o efeito do mesmo na marcação dos anticorpos monoclonais contra os CDs celulares utilizam-no como um fixador da célula já marcada pelos anticorpos e não antes da marcação, como foi realizado no presente estudo. Porém, embora a discrepância de metodologia, os resultados desses estudos relataram que o paraformaldeído não afeta, ou afeta a poucos marcadores, na análise celular por citometria de fluxo na concentração de 0,5% v/v em PBS e que, além disso, é bastante eficiente para a fixação e a conservação celular (POLLICE et al., 1992; STEWART; VILLASMIL; FRAMPTON, 2007; PUI et al., 2012).

Nos estudos que avaliaram a interferência do DTT e do paraformaldeído, foram observadas muitas diferenças entre eles, tais como: nos tipos de clones dos anticorpos monoclonais utilizados, nas marcas dos reagentes, nos protocolos de processamento das amostras, nos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais, nas concentrações do paraformaldeído e nos tempos de incubação. Essas divergências entre os estudos podem justificar a discrepância dos resultados. Por esse motivo, constou-se a importância da avaliação do efeito desses reagentes na qualidade dos resultados antes que se efetuasse a avaliação das células do escarro por citometria de fluxo.

Em um passo seguinte após a padronização, foi realizada a validação da metodologia de citometria de fluxo pela metodologia de microscopia óptica, uma vez que essa já se encontra bem estabelecida como uma forma de contagem e diferenciação dos leucócitos das amostras de escarro. Os resultados das porcentagens de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos das amostras avaliadas concomitantemente pelas duas metodologias foram associados pelos testes estatísticos de Passing Bablok e Bland-Altman. Na avaliação dos resultados obtidos por Passing Bablok (Figura 5), os valores do intercepto para os neutrófilos (-2,4788 – 48,9202), para os linfócitos (-3,2850 – 0,6607) e para os monócitos/macrófagos (-2,6244 – 0,241) demonstraram que os métodos não divergem por um valor constante. As avaliações dos intervalos de confiança da inclinação para os neutrófilos (0,5079-1,0581) e para os linfócitos (0,4857 – 3,1125) revelaram que não existe uma diferença proporcional entre os métodos e, no caso dos monócitos/macrófagos (0,3056 – 0,9937) essa divergência foi



encontrada com valores de porcentagens da microscopia óptica aproximadamente duas vezes maiores do que os da citometria de fluxo. Pela análise do teste de Bland-Altman, pode-se considerar que os métodos apresentaram uma boa concordância para a determinação das porcentagens dos neutrófilos (Figura 6), pois, embora o viés não seja tão próximo de zero, o que seria a situação ideal, a diferença média de 3,3% entre os dois métodos não compromete a determinação da celularidade da amostra, pois, os valores de neutrófilos são, geralmente, superiores a 90%. Na determinação dos linfócitos (Figura 8), a mesma boa correlação também foi encontrada com um viés próximo de zero. Nessa situação, a proximidade com o zero é essencial, pois, a porcentagem de linfócitos das amostras é pequena. Com relação ao viés gerado pela concordância dos métodos na avaliação dos monócitos/macrófagos (Figura 7) essa concordância não foi boa. O viés de 3,2% é considerável já que as porcentagens de monócitos/macrófagos encontradas nas amostras são baixas.

Essa divergência das porcentagens das populações de monócitos/macrófagos obtidas pelas duas metodologias de análise celular pode ser explicada por diversas hipóteses: A primeira consiste no fato de que evidências revelaram que os monócitos, ao saírem do sangue periférico e se maturarem nos tecidos pulmonares em macrófagos, subexpressam CD14 (DOMAGAŁA-KULAWIK et al., 2006; VIDAL et al., 2012). Porém, para a determinação das populações de monócitos/macrófagos foram consideradas também as características de tamanho e granulosidade celular (*gate* em SSC X FSC) e de intensidade de fluorescência para o anti-CD45 (*gate* em SSC X Anti-CD45). Dessa forma, todas as células contidas nas populações delimitadas pelos *gates* anteriormente descritos foram consideradas válidas, mesmo as células com fraca positividade para o anti-CD14. A segunda hipótese considera o fato que, como os macrófagos são as células mais atingidas pela infecção pelo MTB (ERNST, 2012; O'GARRA et al., 2013), modificações na estrutura das células que contém os bacilos poderiam comprometer a ligação dos CDs com os anticorpos monoclonais. Porém, as porcentagens celulares foram utilizadas para a avaliação das associações das frequências dos subtipos leucocitários entre amostras provenientes de indivíduos HIV soropositivos e as dos HIV soronegativos. Portanto, se houver essa interferência na determinação das porcentagens de macrófagos, ela ocorreria de modo proporcional

para os dois grupos de estudos e não afetaria os resultados e conclusões finais. E, por fim, a terceira hipótese considera que a microscopia óptica avalia apenas um número limitado de células por lâmina (400 células), enquanto a citometria de fluxo analisada milhares de células. Como consequência, um desvio proporcional nas populações celulares pequenas, como a dos monócitos/macrófagos, pode ocorrer (VIDAL et al., 2012; VIRGO; GIBBS, 2012). Finalmente, a análise das populações celulares de monócitos/macrófagos das amostras de escarro por citometria de fluxo também foi considerada válida, assim como a dos neutrófilos e linfócitos.

A citometria de fluxo permite ainda a diferenciação de subtipos celulares morfologicamente idênticos (VIRGO; GIBBS, 2012). Sendo assim, além das populações acima descritas, os linfócitos das amostras estudadas identificados morfologicamente somente como linfócitos pela microscopia óptica puderam ser subclassificados como linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T gama/delta e linfócitos T alfa/beta, o que proporciona um melhor conhecimento a respeito da celularidade das amostras.

No presente estudo, as limitações em relação à qualidade da amostra de escarro citadas anteriormente impediram a diferenciação e contagem celular de sete amostras, as quais possuíam pouco volume e, portanto, poucos leucócitos, além de conterem muita saliva e grande quantidade de células epiteliais. A baixa qualidade destas amostras pode ser explicada pela grande dificuldade dos pacientes em realizar a coleta, os quais, ou eram soropositivos ao HIV, ou estavam muito debilitados e, portanto, com dificuldade em fazer muito esforço para tossir. No entanto, todas as limitações da microscopia óptica citadas acima não interferiram na qualidade do resultado da análise por citometria de fluxo. Sendo assim, o imunofenótipo dos subtipos leucocitários nessas amostras foi avaliado somente por citometria de fluxo.

## 7.2 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA E ASSOCIAÇÕES DE VARIÁVEIS ENTRE OS INDIVÍDUOS COM E SEM A COINFEÇÃO HIV/MTB

Segundo os dados do Ministério da Saúde, na cidade de Florianópolis, local onde foi realizado o estudo, registrou-se 106 novos

casos de tuberculose pulmonar e bacilíferos no ano de 2012 (BRASIL, 2012).

Nos trinta casos da população estudada, vinte e um correspondiam à primeira infecção. Se extrapolarmos os dados encontrados em 2012 para o ano deste estudo, pode-se estimar que no período de seis meses em que foi realizada a coleta das amostras (Julho/2013 a Janeiro/2014) seria esperada a inclusão de cinquenta e três novos pacientes para estudo. Porém, a coleta foi realizada somente em hospitais, onde a taxa de casos novos diagnosticados é menor. Segundo o Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose no Brasil (2011), o ideal é que a atenção básica seja a principal porta de entrada do Sistema Único de Saúde (SUS), e não os hospitais (BRASIL, 2011). Com exceção de três pacientes, todos os outros eram internados, uma vez que, as amostras foram coletadas em hospitais. Porém, vale a pena ressaltar que não são todos os casos novos de TB que necessitam de internação. Nas recomendações do Ministério da Saúde para a internação, estão incluídos os casos em que o estado geral não permite tratamento em ambulatório e os casos de situação de vulnerabilidade social, tais como: a ausência de residência fixa, ou os de grupos com maior possibilidade de abandono (BRASIL, 2011). Dessa maneira, devido ao local escolhido para a coleta das amostras, era esperado que uma parte dos pacientes não fosse incluída no estudo. Inicialmente, houve a tentativa de inclusão de pacientes não atendidos nos hospitais e, portanto, não internados. Porém a necessidade de amostras frescas inviabilizou essa estratégia de recrutamento, pois, os pacientes atendidos em unidades básicas de saúde, muitas vezes, não agendam as consultas e procuram a assistência em horários variáveis, não sendo possível estar presente no momento da coleta nas diferentes unidades básicas em Florianópolis.

Dos nove outros casos restantes, um era de reinfecção e oito eram reingressos após abandono de tratamento por um período mínimo de três meses. Um estudo epidemiológico realizado anteriormente na região de Santa Catarina encontrou uma taxa de 10,5% para recidivas e de 9,2% para reingressos após abandono, enquanto que no presente estudo, as taxas foram de 3,3% e 26,7%, respectivamente. Diferenças entre as porcentagens, com uma frequência maior de reingresso após abandono de tratamento, podem ser explicadas pelo fato de que somente foram considerados nessa pesquisa indivíduos atendidos em hospitais, locais

onde existe uma estreita relação entre o critério para internação (vulnerabilidade social) com o reingresso após abandono (RAMOS et al., 2010). Não foi encontrado o número de casos de recidiva e reingresso após abandono de tratamento da população geral de Florianópolis, porém o número de indivíduos com reingresso após abandono deve ser maior do que a quantidade de casos incluídos neste estudo. A perda dessas amostras também pode ser justificada pelo mesmo motivo já citado acima com relação aos casos novos.

As características gerais dos pacientes, como gênero, idade, sorologia ao HIV e presença de outros agravos relacionados ao desenvolvimento da TB, estão de acordo com os dados encontrados na literatura. O grupo de pacientes incluídos no presente trabalho apresentou predomínio do gênero masculino (86,7%; Feminino:13,3%) (Tabela 6). Esses dados são semelhantes àqueles encontrados em outros estudos realizados com pacientes de TB também atendidos no Hospital Nereu Ramos, nos quais houve o predomínio do gênero masculino, com taxas de 77,5% (SILVA et al., 2010) e de 60,8% (WILDNER, 2012). Dados nacionais e mundiais também reportam esta realidade, com uma proporção de aproximadamente duas vezes mais casos de portadores de TB no gênero masculino do que no feminino (HIJAR, PROCÓPIO, 2006; MATTOS et al., 2006; GONÇALVES; CAVALINI; VALENTE, 2010; WHO, 2013). A explicação para essa diferença entre os gêneros pode estar relacionada com fatores biológicos, mas também com fatores sociais, econômicos e culturais que desencadeiam comportamentos masculinos distintos dos femininos, como um maior uso de drogas ilícitas e álcool, que são fatores de risco para o desenvolvimento de TB (REHM et al., 2009)

A faixa etária dos pacientes que participaram deste trabalho variou de 18 a 62 anos, com a média de idade de 47,7 anos (Tabela 6). Como visto na população estudada, a TB acomete predominantemente adultos jovens. O mesmo também foi relatado por Mattos e cols. (2006), Silva e cols. (2010), Nogueira (2012) e Wildner (2012) que observaram médias de idade próximas a 40 anos. No cenário mundial, a situação não é diferente, segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 60% dos casos mundiais de TB estão dentro da faixa etária de 15 a 45 anos (WHO, 2013). O acometimento da tuberculose em adultos jovens, atingindo esses indivíduos justamente na sua fase mais produtiva acarreta um ônus para suas famílias como também para o

país. A tuberculose deixa o indivíduo muito debilitado e, em muitas situações, o afastamento do trabalho é necessário.

Na avaliação dos laudos de exames radiológicos de 23 pacientes, todos os laudos apresentaram achados sugestivos de tuberculose pulmonar, como infiltração alveolar, infiltração intersticial e escavações (Tabela 6). O estudo radiológico nos pacientes com baciloscopia positiva tem por finalidade a exclusão de outras doenças pulmonares associadas, como câncer de pulmão em tabagistas com consumo de alta carga de cigarro e com idade acima de 40 anos (BENTO et al., 2011; BRASIL, 2011).

Os pacientes incluídos neste estudo apresentaram os seguintes agravos relacionados à TB: tabagismo, uso de drogas ilícitas e etilismo (Figura 9). A infecção pelo HIV, considerada um dos fatores de risco mais significativos para o desenvolvimento da TB, foi abordada de forma especial e, portanto, não está classificada juntamente com os outros agravos.

A associação do etilismo com o a TB vem sendo reportada há muitos anos (HUDOLIN, 1975) e continua representando um importante fator de risco para TB na atualidade, como pode ser observado em diversos estudos (MONTI, 2000; REHM, 2009; WILDNER, 2012; NOGUEIRA, 2012). No presente estudo, o etilismo foi classificado como o terceiro fator de risco mais frequente, perdendo para o uso de drogas ilícitas e tabagismo. Evidências indicam que pode haver uma relação dose-dependente entre os níveis de consumo de álcool e o desenvolvimento da TB (REHM, 2009). Todos os pacientes incluídos neste estudo relataram consumo de álcool e ingestão excessiva diária, principalmente de destilados. Porém, é importante considerar que o uso abusivo de álcool e suas consequências no organismo humano não podem ser classificados como um fator de risco isolado. Juntamente com eles muitas outras condições que favorecem o desenvolvimento da TB estão envolvidas, tais como: marginalização social, desnutrição, moradia em rua, vivência em aglomerados e também o uso de drogas ilícitas (LÖNNROTH et al., 2008).

O uso de drogas ilícitas também é considerado um fator de risco importante para o desenvolvimento da TB e foi o mais frequente observado entre os pacientes que participaram dessa pesquisa. Embora a literatura traga uma forte associação de TB a uso de drogas injetáveis, o presente estudo e outros conduzidos em Santa Catarina (NOGUEIRA,

2012; WILDNER, 2012) demonstraram que o *crack* é droga mais citada entre os pacientes desta região. A alta prevalência de TB entre os usuários de drogas ilícitas pode ser explicada pelos efeitos fisiológicos das drogas, que afetam o funcionamento do sistema imune e aumentam a susceptibilidade dos indivíduos a doenças infecciosas (FRIEDMAN; NEWTON ; KLEIN, 2003). Além do efeito biológico também se somam à justificativa da alta prevalência o meio ambiente em que vivem e os comportamentos de risco que desenvolvem, tais como: o consumo excessivo de tabaco e bebidas alcoólicas (REHM, 2009). Essa associação pode ser observada em todos os países e a preocupação mundial com tal condição levou ao desenvolvimento de uma *guideline* para melhor coordenar as condutas de cuidados com TB entre os usuários de drogas (WHO, 2008). O tabagismo foi um fator de risco presente de modo significativo entre os indivíduos incluídos no presente trabalho. Somente 20% desses relataram nunca ter tido contato ativo com o cigarro, e dos 80% restantes, 63,3% afirmaram serem fumantes, dos quais mais da metade alegaram fumar mais de uma carteira de cigarros por dia. Atualmente, aproximadamente 20% da população mundial é tabagistas, isto é, mais de um bilhão de pessoas (WHO, 2011). Esse percentual aumenta quando consideramos somente os países mais pobres, locais onde o índice de TB também é maior (WHO, 2013). O fumo é considerado um importante fator de risco para a TB (WHO, 2013) e influencia positivamente na ocorrência da doença de acordo com a dose de tabaco consumida diariamente e o período de exposição ao tabaco durante a vida (LIN; EZZATI; MURRAY, 2007). Além disso, um aumento da taxa de mortalidade por causa da TB tem sido fortemente associada com o tabagismo (PEDNEKAR; HAKAMA; GUPTA, 2012). Em um estudo matemático desenvolvido por Basu e cols. (2011), verificou-se que o tabagismo pode aumentar substancialmente os casos de tuberculose (aproximadamente 18 milhões de casos) e de mortes no mundo (aproximadamente 40 milhões de mortes) entre 2010 e 2050. O estudo também demonstra que, se as tendências de uso do fumo continuarem, elas podem causar um atraso no controle da mortalidade por TB em, pelo menos, 20 anos. Muitas explicações relacionadas com o aumento da ocorrência da TB em fumantes têm sido relatadas na literatura. Sopori (2002) propôs que o tabagismo altera a função dos macrófagos alveolares pela redução da sua capacidade de fagocitar o bacilo, além de induzir a diminuição da

produção de citocinas pró-inflamatórias por estes importantes componentes que atua no combate inicial do MTB pelo organismo infectado. Wang e cols. (2003) sugerem que a nicotina age diretamente sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina em macrófagos, diminuindo a produção intracelular de TNF- $\alpha$  e, dessa maneira, prejudica a morte intracelular do MTB. Em uma explicação mais alternativa, pesquisadores sugerem que os macrófagos alveolares de indivíduos tabagistas contêm uma quantidade de ferro significativamente elevada quando comparado aos macrófagos dos não tabagistas. Como consequência desse aumento do ferro leva a redução da produção de fator de necrose tumoral- $\alpha$  e óxido nítrico (BOELAERT, J.R.; GOMES, M.S.; GORDEUK, 2003). Diante disso, o controle rigoroso do uso do tabagismo é de grande importância para a redução dos casos de TB e estima-se que até 2050 esse controle poderia evitar aproximadamente 27 milhões de mortes por TB atribuíveis ao fumo (BASU et al., 2011).

Com o advento da aids houve um grande aumento do número de indivíduos que desenvolveram TB a partir de uma infecção prévia pelo MTB (MUNAWWAR; SINGH, 2012). Em 2009, a taxa de coinfeção no estado de Santa Catarina foi de 23% (DIVE, 2009), a qual está próxima da taxa encontrada no presente estudo (26,7%) (Tabela 6). Embora haja concordância de dados, o esperado era que as taxas deste estudo fossem maiores, pois, foram coletadas em hospitais, onde os pacientes com HIV geralmente desenvolvem um quadro mais grave de TB, procurando os hospitais com uma maior frequência. A discrepância com as taxas esperadas pode ser explicada pelo fato de que pacientes com HIV possuem dificuldades para coletar escarro e como para a realização deste trabalho eram necessárias amostras frescas, a maioria dos pacientes com a coinfeção que se enquadrariam nos critérios de inclusão no estudo não conseguiram coletar, uma melhor análise dos resultados de pacientes com essa característica clínica foi dificultada. Muitas vezes, os enfermeiros relataram que a coleta de amostra de escarro dos pacientes HIV soropositivos para o diagnóstico foi feita de modo induzido. Porém, optou-se por não realizar a indução do escarro nos pacientes, pois, isso alteraria toda a rotina dos hospitais, além de aumentar o risco de contaminação dos profissionais da saúde e submeter o paciente a uma situação de estresse considerada dispensável.

De todas as variáveis que foram associadas com a presença ou ausência da coinfeção MTB/HIV, somente os resultados da

baciloscopia e da cultura apresentaram uma associação significativa (Tabela 9). Isto se deve ao fato de que o diagnóstico para tuberculose pulmonar ativa em pacientes soropositivos ao HIV é mais difícil, pois, esses indivíduos geralmente não apresentam tosse produtiva e o escarro desses pacientes geralmente possui uma pequena quantidade de bacilo (GETAHUN et al., 2010; PATEL; THAKRAR; GHANCHI, 2011). Pela associação dos resultados das baciloscopias das amostras dos pacientes soropositivos e soronegativos ao HIV (Tabela 9), foi observada uma frequência de aproximadamente quatro vezes maior de resultados de amostras como “positivo +” (62,5%) para pacientes coinfectados quando comparados com os portadores somente de TB (13,6%). Esse quadro também se refletiu no resultado da cultura, no qual houve uma associação positiva entre a positividade da cultura e ausência da coinfeção (Tabela 9). Embora a cultura tenha uma maior sensibilidade diagnóstica do que a baciloscopia (BRASIL, 2008; BENTO, 2011; BRASIL, 2011), a negatividade da cultura para pacientes soropositivos ao HIV com registro de baciloscopias positivas ao diagnóstico pode ser explicada pelo fato de que novas amostras foram coletadas para o presente estudo e, portanto, não foram as mesmas amostras do diagnóstico. Com a nova coleta, é possível que as amostras analisadas neste trabalho estivessem mais paucibacilares ou até mesmo com ausência de bacilos. Além disso, as amostras desses pacientes geralmente eram de baixa qualidade por conterem muita saliva e pouco material purulento, fato que pode também contribuir para a obtenção de resultados negativos das culturas.

O exame radiológico e a associação entre os pacientes com e sem a coinfeção para o HIV possui a tendência de ser significativa, pois, os resultados de exames de imagem de pacientes com TB/aids podem se apresentar sem alterações em aproximadamente 14% dos casos confirmados de TB ativa (WHO, 2009). Outro fator muito importante que pode influenciar a ocorrência das alterações radiológicas que deve ser considerado é a quantidade de células TCD4<sup>+</sup> dos indivíduos. Quando a contagem celular de TCD4<sup>+</sup> for inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>, a maioria dos resultados radiológicos é atípica. Porém, nos casos em que essa contagem é superior a 200 células/mm<sup>3</sup>, as alterações radiológicas se apresentam de maneira similar às aquelas observadas em pacientes portadores de TB e soronegativos ao HIV (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; BENTO et al., 2011; SILVA; ROSA; LEMOS, 2006;



DESALU et al, 2010). No presente estudo, todos os pacientes coinfectados e que tiveram os seus laudos radiológicos analisados possuíam células TCD4<sup>+</sup> superiores a 200 células/mm<sup>3</sup> e, portanto, a ausência da associação dos resultados radiológicos de indivíduos com e sem a coinfeção era esperada (Tabela 7).

Com relação aos fatores: gênero, idade, uso de drogas ilícitas, tabagismo, classificação do tabagismo e etilismo; a ausência de alguma associação entre os dois grupos revela que os perfis dos pacientes soropositivos e soronegativos ao HIV e com TB não diferem e, portanto, os dois grupos possuem características semelhantes estão expostos aos mesmos fatores de risco e de maneira semelhante, independentemente da sua condição sorológica ao HIV.

### 7.3 A AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE DO ESCARRO DE PACIENTES SORONEGATIVOS E SOROPOSITIVOS AO HIV

Para a avaliação da resposta imune que ocorre nos processos de desenvolvimento da tuberculose pulmonar, muitos estudos da literatura avaliam as células de amostras de lavados broncoalveolares. Entretanto, para obtenção dessas amostras é necessária a realização de um procedimento invasivo, além de uma estrutura hospitalar adequada e a supervisão de um capacitado. Em um trabalho recente, os autores observaram que, ao comparar resultados sobre macrófagos com amostras de lavado broncoalveolar e de escarro induzido, ambas reproduziram os mesmos resultados (FU; SOHASKEY; JONES, 2013). Portanto, a utilização de amostras de escarro também é válida para o estudo da celularidade pulmonar e possui a vantagem de ser uma amostra obtida por um procedimento não invasivo. Antes mesmo da validação desse trabalho, a celularidade do escarro já consistia em um importante alvo de estudos de outros pesquisadores (PIN et al., 1992; IREDALE et al., 1994; PIZZICHINI et al., 1996; HARGREAVE, 1999) por se tratar de um material rico em células provenientes do pulmão e fácil de coletar. Com a finalidade de facilitar a interpretação da celularidade do escarro para identificação da presença, do tipo e do grau de inflamação nas vias respiratórias dos pulmões, Belda e cols.(2000) determinaram, pela metodologia de microscopia óptica, os valores de referência para amostras de escarros induzidos provenientes de pacientes hígidos, os quais foram estabelecidos com as seguintes porcentagens: 1,1% para os

eosinófilos, 37,5% para os neutrófilos, 58,8% para os macrófagos e 1,0% para os linfócitos.

Em um estudo prévio, Silva e cols. (2010) avaliaram a celularidade do escarro de 40 indivíduos com tuberculose pulmonar por microscopia óptica e relataram a presença média de 33,7% de neutrófilos, 1,7% de eosinófilos, 50,7% de macrófagos e 12,3% de linfócitos. Como pode ser observado há um importante aumento dos valores relativos aos linfócitos quando comparados ao valor de referência. Nesse mesmo trabalho, ao subdividirem as amostras em dois grupos, soropositivos e soronegativos ao HIV, não foram encontradas diferenças significativas na celularidade do escarro entre os subgrupos. O estudo ainda relatou que a média de células TCD4+ no sangue periférico dos pacientes com a coinfeção HIV/TB foi de 95,4 células/mm<sup>3</sup>, o que retrata um quadro de imunodeficiência importante, pois, está abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>, valor considerado como limite entre os estados aceitáveis e preocupantes de imunodeficiência para pacientes com sorologia positiva ao HIV. Esses resultados sugerem que apesar dos indivíduos soropositivos terem apresentado depleção do sistema imune, não há diferenças da resposta leucocitária pulmonar à infecção causada pelo MTB entre os dois grupos de pacientes estudados. Considerando esses resultados, os autores sugeriram que as características fisiopatológicas da tuberculose pulmonar nos pacientes soropositivos podem ser uma consequência das alterações qualitativas da resposta imune dos linfócitos e não das alterações quantitativas. Portanto, a avaliação dos tipos específicos de linfócitos envolvidos na resposta imune se faz necessário para um melhor entendimento do alto risco dos pacientes soropositivos ao HIV em desenvolver TB. Sendo assim, este trabalho teve como um dos objetivos avaliar a celularidade do escarro por citometria de fluxo, pois, esse método possibilita a classificação dos subtipos de linfócitos T.

Neste trabalho, do total de linfócitos T (100%), foram observados em média 12,31% de linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+), 24,13% de linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+), 0,02% de linfócitos T com fenótipo CD4+ e CD8+ e 62,85% de linfócitos T gama/delta ( $\gamma\delta$ ) (CD3+CD4-CD8-) (Tabela 10). Como pode ser observado, apenas uma pequena porcentagem de linfócitos TCD4+ compunha a celularidade das amostras analisadas. No entanto, este resultado não era o esperado, pois, diversos estudos com sangue periférico e revisões na literatura

(DEVECI et al., 2006; VEENSTRA et al., 2006; LIM et al., 2013; XI et al., 2013) demonstram um grande envolvimento dos linfócitos TCD4+ no controle do desenvolvimento da resposta imune celular contra a TB, especialmente os do tipo Th1, produtores das principais citocinas, como o INF- $\gamma$  (FLYNN; CHAN, 2001; NICOD, 2007; NANDI; BEHAR, 2011

Depois das células T  $\gamma\delta$ , as células T CD8+ foram as mais frequentes nas amostras de escarro analisadas (Tabela 10). Estudos afirmam que os linfócitos citotóxicos estão intimamente envolvidos na resposta ao hospedeiro, pois, secretam citocinas importantes, como o INF- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  ao reconhecerem antígenos micobacterianos através de moléculas MHC de classe I de células apresentadoras de antígenos (PATHAN et al., 2000). Além disso, os linfócitos TCD8+ possuem a capacidade de matar as células infectadas pelo bacilo via mecanismo dependente de grânulos envolvendo perforina e granulicina (NICOD, 2007). As células TCD8+ ainda estão presentes dentro do granuloma, onde elas têm acesso às células infectadas e auxiliam na prevenção da disseminação bacilar. (CACCAMO et al., 2006).

Embora a diferença entre as médias das porcentagens de linfócitos T citotóxicos nas amostras de pacientes soronegativos ( $18,16 \pm 11,59$ ) e soro-positivos ( $40,56 \pm 29,61$ ) ao HIV não tenha sido significativa, foi observado uma maior quantidade dessas células em pacientes com a coinfeção HIV/MTB. Essa quantidade elevada de células T CD8+ pode ser explicada pelo fato de que o influxo de células T CD8+ nos pulmões é maior em pacientes soropositivos ao HIV. As células T citotóxicas aumentam a expressão de marcadores de ativação celular, como o INF- $\gamma$  e IL-2 em resposta aos antígenos micobacterianos, porém não são capazes de controlar, de maneira eficiente, o desenvolvimento MTB e impedir a ocorrência da TB ativa (BECK, 2005; SUTHERLAND et al., 2010).

Como mostra a Tabela 10, os linfócitos T  $\gamma\delta$  foi o subtipo de linfócito T mais frequente nas amostras de escarro incluídas neste estudo. Carvalho e cols. (2002) demonstraram que pacientes portadores de TB, independentemente do seu estado sorológico ao HIV, possuem uma redução da quantidade de linfócitos T  $\gamma\delta$  no sangue periférico quando comparados com indivíduos hígidos. Rudolf-Oliveira (2013) estabeleceu que os linfócitos T  $\gamma\delta$  (CD3+CD4-CD8-) estão presentes no sangue periférico em um percentual de 4,8% em relação ao total das células T (CD3+). Essa porcentagem equivale a um número pequeno de

células se forem considerados todos os leucócitos do sangue periférico e, portanto, a diminuição dessas células em sangue periférico observada por Carvalho e cols. (2010) em pacientes com TB poderia ser justificada pela grande frequência de linfócitos T  $\delta\gamma$  encontrada no escarro. Em conjunto, esses resultados sugerem que essas células migrem do sangue periférico para os pulmões com a finalidade de auxiliar a resposta imune celular local. Dieli e cols. (2003), ao realizarem experimentos em camundongos, observaram esse influxo de células para o pulmão e consideraram um evento importante para o desenvolvimento da resposta imune, principalmente no início da infecção. Os linfócitos T  $\delta\gamma$  desempenham um importante papel dentro do sistema imunológico, a sua ativação ocorre pelo reconhecimento de alguns antígenos micobacterianos ligados ou não a moléculas de MHC associadas a células apresentadoras de antígenos (XI et al., 2013). Evidências indicam que os linfócitos T  $\gamma\delta$  são importantes indutores da produção de IL-17 em resposta ao estímulo por IL-23, produzida por diversas células, como células dendríticas infectadas pelo MTB. A IL-17 induz quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e mobilização e ativação de granulócitos (KOLLS; LINDEN, 2004; LINDEN; LAAN; ANDERSON, 2005). O desenvolvimento de um estudo em camundongos observou que a IL-23 está presente nos pulmões no início da infecção, e a produção de IL-17 por linfócitos T  $\gamma\delta$  ocorre antes da produção de INF- $\gamma$  por linfócitos TCD4+. Com o progresso da infecção, embora linfócitos TCD4+ do tipo Th17 produtores de IL-17 tornam-se presente no local da infecção, os linfócitos T  $\gamma\delta$  continuam desempenhando um importante papel na produção de IL-17. Esse estudo mostra que os linfócitos T  $\gamma\delta$  participam da primeira linha de defesa do organismo antes mesmos dos linfócitos TCD4+, (LOCKHART; GREEN; FLYNN, 2006). Esse fato permite a formulação de duas hipóteses para justificar essa grande quantidade de linfócitos T  $\gamma\delta$  nas amostras associadas à baixa quantidade de células T CD4+, encontradas neste trabalho. A primeira hipótese sugere que a resposta imune realizada pelas células T CD4+ possa ocorrer mais tardiamente, pois, neste trabalho, as amostras foram coletadas poucos dias após o diagnóstico. A segunda indica que, por algum motivo que não esteja relacionado com a infecção pelo HIV, as células TCD4+ não estão migrando para os pulmões e, dessa forma, os linfócitos T  $\gamma\delta$ , juntamente

com os linfócitos T citotóxicos migram para o pulmão com o objetivo de combater e controlar a disseminação dos bacilos do MTB.

Como demonstrado na Tabela 10, os neutrófilos (95,68%) compunham maior percentual do que os monócitos/macrófagos (2,62%) e os linfócitos (1,64%) na celularidade total das amostras de escarro analisadas. Esse fato foi curioso, pois, o esperado era encontrar grande quantidade de macrófagos e de linfócitos, as quais são as células mais envolvidas no combate à infecção pelo MTB descritas na literatura (RAJA, 2004; DEVEC et al., 2006; PHILIPS; ERNST, 2012; ). Porém, esses achados corroboram os resultados de EUM e *cols.* (2010) que, ao avaliar a celularidade do escaro de paciente com TB pulmonar por microscopia óptica, encontrou uma grande 86,6% de neutrófilos.

A produção de  $\text{INF-}\gamma$  pelas células  $\text{TCD4}^+$  do tipo Th1 inibe a produção de IL-17, a qual regula o recrutamento de neutrófilos. Além disso, o  $\text{INF-}\gamma$  também inibe o acúmulo patogênico dos granulócitos nos pulmões infectados pelo MTB e prejudica a sobrevivência dos neutrófilos. Esse mecanismo regulatório dos neutrófilos é importante, pois, a sua ação inflamatória prejudica o hospedeiro e interfere na capacidade de controle do desenvolvimento do MTB dentro do hospedeiro. Dessa forma, nos casos em que ocorre excesso de neutrófilos, a morbidade da TB pode ser tanto devido ao desenvolvimento de uma inflamação prejudicial ao hospedeiro quanto à perda da atividade antimicrobiana. Portanto, a grande quantidade de neutrófilos nos pulmões sugere a falha da resposta Th1 e, conseqüentemente, a diminuição da resposta induzida por  $\text{INF-}\gamma$  (NANDÍ; BEHAR, 2011). O grande acúmulo de neutrófilos nas amostras dos pacientes participantes do estudo conjuntamente com a baixa quantidade de linfócitos  $\text{TCD4}^+$  permite reforçar a hipótese de que os indivíduos apresentam falha no desenvolvimento da resposta imune, principalmente naquelas relacionadas aos linfócitos T  $\text{CD4}^+$ , o que pode justificar uma das causas para o desenvolvimento da doença ativa nesses indivíduos. A avaliação da citocina  $\text{INF-}\gamma$  em amostras de escarro de indivíduos com e sem TB, principalmente naqueles que vivem em contato constante com portadores da TB, como parentes e cuidadores, seria uma estratégia interessante para a verificação desta hipótese. Por outro lado, é importante enfatizar que outros estudos sugerem que os neutrófilos podem auxiliar na resposta imune contra TB (LOWE et al., 2012). Acredita-se que isso ocorra quando os neutrófilos

estejam presentes em quantidades controladas, pois, em doenças bem estabelecidas e/ou doenças avançadas há um aumento da quantidade de neutrófilos (EUM et al., 2010; LOWE et al., 2012). Esses achados corroboram os nossos resultados.

Os monócitos/macrófagos foram encontrados em uma pequena quantidade nas amostras, com uma frequência bem abaixo daquela estabelecida como referência (2,62% *vs* 58,5%) (Tabela 10). Os macrófagos alveolares são as primeiras células do sistema imune a ter contato com o MTB. O estímulo causado na infecção dos pulmões pelo MTB induz a migração de monócitos para o local, onde se diferenciam em diversos subtipos de macrófagos (DIEDRICH; FLYNN, 2011). No entanto, as micobactérias conseguem induzir a morte dos macrófagos em benefício próprio. No início, elas inibem a apoptose celular para favorecer a sua replicação e, posteriormente, induzem a morte dos macrófagos por necrose para escaparem dessas células e infectarem outras novas. Porém, não está muito claro o mecanismo exato pelo qual a bactéria promove esta regulação da morte celular (ASHIDA et al., 2011; WELIN, 2011). Portanto, a pequena porcentagem de monócitos/macrófagos encontrada nas amostras de escarro neste trabalho pode estar relacionada com a fase de indução de morte celular causada pelas micobactérias.

Como demonstrado na Tabela 11, houve diferença significativa entre a quantidade de macrófagos nas amostras de indivíduos soropositivos e soronegativos ao HIV, com frequência ainda menor de monócitos nas amostras dos pacientes coinfectados. Ao invadirem o corpo humano, o vírus do HIV não somente infecta os linfócitos TCD4+ como também tem a capacidade de invadir todos os subtipos de macrófagos, inclusive aqueles alojados dentro dos pulmões. Esta infecção pelo HIV provoca a indução da morte celular, além de alterações nas funções celulares que comprometem a fagocitose e a produção de citocinas (BAUER et al., 2008; DIEDRICH; FLYNN, 2011). Sendo assim, a morte dos monócitos provocada pelo MTB e pelo HIV na coinfecção pode estar relacionada com a diminuição significativa da quantidade de monócitos/macrófagos em amostras de indivíduos coinfectados quando comparadas as amostras de indivíduos soronegativos ao HIV.

Na associação da celularidade do escarro de pacientes não portadores e portadores de TB pulmonar (Tabela 12), a menor

porcentagem de monócitos/macrófagos e a maior porcentagem de linfócitos T gama/delta nas amostras dos pacientes portadores de TB reforçam as hipóteses de que as micobactérias induzem a morte dos monócitos/macrófagos (ASHIDA et al., 2011; WELIN, 2011) e de que os linfócitos T gama/delta possuem um importante papel no combate do bacilo pelo organismo infectado (DIELI et al., 2003; LOCKHART; GREEN; FLYNN, 2006; XI et al., 2013).

Muitos estudos ainda são necessários para a confirmação das hipóteses formuladas neste trabalho, porém as alterações da celularidade pulmonar relatadas deixam clara a influência da infecção pelo MTB no desenvolvimento de uma resposta imune do tipo celular. Com relação à coinfeção, a ocorrência de uma pequena diferença das frequências dos subtipos leucocitários entre os indivíduos soropositivos e soronegativos ao HIV demonstra que a influência do HIV no desenvolvimento da TB não ocorre devido a alterações quantitativas das células, mas, provavelmente, estão relacionadas com as alterações celulares qualitativas. O estudo da função celular com marcadores de ativação e dosagem de mediadores inflamatórios é de grande relevância para um melhor entendimento a respeito do aumento da chance dos indivíduos coinfectados em desenvolver a TB ativa.





## 8 CONCLUSÕES

A compilação dos resultados encontrados neste estudo permitiu concluir que:

1. Em relação à padronização da metodologia para avaliação do fenótipo das células presentes no escarro pelo método de citometria de fluxo, o tratamento das células com o reagente DTT conjuntamente com o paraformaldeído não altera a expressão dos marcadores celulares CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD80, CD163, CD19, CD14;
2. Para a análise das amostras de escarro pela metodologia de citometria de fluxo os marcadores mais sensíveis a reação antígeno-anticorpo nas amostras de escarro analisadas foram: CD45, CD3, CD4, CD8, CD14 e CD16;
3. O perfil dos indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa, soropositivos ou soronegativos ao HIV, corresponde a indivíduos do gênero masculino e adultos jovens, os quais possuem pelo menos um dos agravos associados a TB, como tabagismo, etilismo, usuário de drogas ilícitas e soropositividade ao HIV;
4. Os neutrófilos (95,68%) compunham maior percentual do que os monócitos/macrófagos (2,62%) e os linfócitos (1,64%) na celularidade total das amostras de escarro de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa e bacilíferos. Do total de linfócitos T (100%) avaliados 12,31% foram de linfócitos T auxiliares (CD4+), 24,13% de linfócitos T citotóxicos (CD8+), 62,85% de linfócitos T gama/delta ( $\gamma\delta$ ) e 0,02% de linfócitos T com fenótipo CD4+ e CD8+.
5. Não houve associação estatisticamente significativa entre os indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa, bacilíferos e soronegativos ao HIV com os soropositivos ao HIV quando comparados os percentuais de neutrófilos, linfócitos totais, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares, linfócitos T  $\gamma\delta$  e linfócitos T  $\alpha\beta$  presentes nas amostras de escarro desses indivíduos.

6. Houve associação estatisticamente significativa entre os indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa, bacilíferos e soronegativos ao HIV com os soropositivos ao HIV quando comparados os percentuais de monócitos/macrófagos presentes nas amostras de escarro desses indivíduos.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a citometria de fluxo é uma metodologia de grande importância para o estudo da celularidade do escarro de pacientes portadores de tuberculose ativa e bacilíferos, pois, possibilita a análise de amostras de baixa qualidade, que não podem ser analisadas por microscopia óptica. Além disso, a citometria de fluxo permite a avaliação de subtipos de linfócitos presentes nas amostras de escarro desses indivíduos, o que contribui cientificamente para o enriquecimento das informações associadas à imunologia da coinfeção MTB/HIV.

## 9 PERSPECTIVAS

- ✓ Continuar a realização do presente trabalho para a obtenção de um número maior de amostras;
- ✓ Desenvolver um painel de anticorpos para análise de marcadores de ativação celular, principalmente relacionados aos linfócitos e macrófagos;
- ✓ Criar um painel de anticorpos para análise de citocinas que tenham um importante papel na imunologia contra a infecção pelo MTB, como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10, IL-17, IL-17;
- ✓ Aplicar os novos painéis criados para análise de amostras de escarros, por citometria de fluxo, provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar e bacilíferos, soropositivos ou soronegativos ao HIV;



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S; [tradução de Claudia Reali e outros]. **Imunologia Celular e Molecular** – Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p.3 – 17.
- ALTMAN DG, BLAND JM. Measurement in Medicine: The analysis of method comparison studies. **Journal of the Royal Statistical Society. Series D (The Statistician)**, v.32, n.3, p.307-317, 1983.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.161. p.1376–1395, 2000.
- ASHIDA, H.; MIMURO, H.; OGAWA, M.; KOBAYASHI, T.; SANADA, T.; KIM, M.; SASAKAWA, C. Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. **Journal of Cell Biology**, v.28, p.931-942, 2011.
- ATWOOD, W.J.; BERGER, J.R.; KADERMAN, R.; TORNATORE, C.S; MAJOR, E.O. Human immunodeficiency virus type 1 infection of the brain. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.4, p.339-366, 1993.
- BATISTA, R.S.; GUEDES, A.G.M.; GOMES, A.P.; PINTO, L.F.S.; DE-PINA-COSTA, A.; MELLO, A.R.; PEREIRA, E.G.; OLIVEIRA, F.R.; FRAGA, R.M.; Martins, M.; Sucupira, E.D.; Freitas, L.R. Resposta imune ao Mycobacterium tuberculosis: nível de conhecimento de profissionais de Saúde da Família do Estado do Rio de Janeiro antes e após capacitação sobre tuberculose. **Pulmão RJ**, v.15, n.4, p. 238-246, 2006;
- BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. *In*: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007.

BASTOS, M.L.; SANTOS, S.B.; SOUZA, A.; FINKMOORE, B.; BISPO, O.; BARRETO, T.; CARDOSO, I.; BISPO, I.; BASTOS, F.; PEREIRA, D.; RILEY, L.; CARVALHO, E.M.; Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v.12, n.199, p.1-8, 2012.

BAUER, A.; HOGUE, I.B.; MARINO, S.; KIRSCCHNER, D. The Effects of HIV-1 Infection on Latent Tuberculosis. **Mathematical Modelling of Natural Phenomena**, v.3, n.7, p.229-266, 2008.

BAZZO, M.L.; FERREIRA, L.A.P.; SILVA, R.M.; SCHEFFER, M.; CHAGAS, M.; SEVERINO, J.L.; ROVARIS, D.B.; NAUCK, R.; FERREIRA, P.C.P. Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnósticodemicobacterioses por PCR. 24 **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.33, n.3, p. 23-27, 2004.

BECK, J. The immunocompromised Host. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.2, p.423-427, 2005.

BELDA, J.; LEIGH, R.; PARAMESWARAN, K.; O'BYRNE,P.M.; SEARS, M.R.; HARGREAVE, F.E. Induced Sputum Cell Counts in Healthy Adults. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.161, n.2, p. 475-478, 2000.

BENTO, J. SILVA, A.S., RODRIGUES, F., DUARTE, R. Métodos diagnósticos em tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, v.24, n.1, p. 145-154, 2011.

BILIĆ-ZULLE, L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. **Biochemica Medica**, v.21, n.1, p.49-52, 2011.

BLOMGRAN, R.; DESVIGNES, L.; BRIKEN, V.; ERNST, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naïve CD4 T cells. **Cell Host Microbe**, v.11, n.1, p.81-90, 2012.

BOELAERT, J.R.; GOMES, M.S.; GORDEUK, V.R. Smoking, iron, and tuberculosis. **Lancet** , v.362, p.1243-1244, 2003.

BOLD, T.D.; ERNST, J.D. Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? *Cell*, v.136, p.17-19, 2009.

BONECINI-ALMEIDA, M.G.; LAPA-SILVA, J.R.; KRITSKI, A.L.; NEVES-JUNIOR, I.; MORGADO, M.G.; NATHAN, C.; HO, J.L. Immune Response During HIV and Tuberculosis Co-infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, n.3, p.399-402, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças**. 2004. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/criterios\\_aids\\_2004.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/criterios_aids_2004.pdf)>. Acesso em: dez/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1.ed. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_laboratorio\\_tb.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf)>. Acesso em nov/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil**. Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. **DATASUS: taxas de incidência da tuberculose, 2012**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2010/d0202.def>>. Acesso em: jan/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programana Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**, 2013a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tecnica\\_versao\\_28\\_de\\_agosto\\_v\\_5.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf)>. Acesso em nov/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Tuberculose: alinhada com o social, afinada com a tecnologia, v. 44, n.2, 2013b. Disponível em<[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/10/boletim2\\_2013\\_tb\\_web.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/10/boletim2_2013_tb_web.pdf)>. Acesso em dez/2013.

BROOKS, C.R.; VAN DALEN, C.J.; HERMANS, I.F.; DOUWES, J. Identifying Leukocyte Populations in Fresh and Cryopreserved Sputum Using Flow Cytometry. **Cytometry Part B**, v.84B, p.104–113, 2013

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; SOOLINGEN, D. V.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p.3684-3689, 2002

CACCAMO, N.; MERAVIGLIA, S.; MENDOLA, C.L.; GUGGINO, G.; DIELI, F.; SALERNO, A. Phenotypical and Functional Analysis of Memory and Effector Human CD8 T Cells Specific for Mycobacterial Antigens. **The Journal of Immunology**, v.177, p.1780-1785, 2006.

CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**, v. 15, p. 29-35, 2006.

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

CHEN, J.; ZHANG, R.; WANG, J.; LIU, L.; ZHENG, Y.; SHEN, Y.; QI, T.; Lu, H. Interferon-Gamma Release Assays for the Diagnosis of Active Tuberculosis in HIV-Infected Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One**, v.6, n.11, p.1-7, 2011.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; UEKY, S. Y.; MARTINS, M. C.; DURHAM, A. M.; ARBEIT, R. D.; LEÃO, S. C. Reliable identification



of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. **BMC Microbiology**, v.8, n.48, p. 1-12, 2008.

COOK, G. M.; BERNEY, M.; GEBHARD, S.; HEINEMANN, M.; COX, R.; DANILCHANKA, O.; NIEDERWEIS, M. Physiology of mycobacteria. **Advances in microbial physiology**, v. 55, p. 81-182, 2009.

COOPER, A.M. Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. **The Annual Review of Immunology**, v.27, p.392-422, 2009.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERANRDELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1305-1314, 2003

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PICON, P.D.; Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. **Revista de Saúde Pública**, v.41, Suppl.1, p. 34-42, 2007.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

DESALU, O.O.; , OLOKOBA, A.; DANFULANI, M.; GAMBO, Z.; SALAWU, F.; DAMBURAM, A.; MIDALA, J. Impact of Immunosuppression on Radiographic Features of HIV Related Pulmonary Tuberculosis among Nigerians. **Tur Toraks Der**, v.10, p.112-116, 2010.

DEVECI, F.; AKBUTUT, H.H.; CELIK, I.; MUZ, M.H.; ILHAN, F. Lymphocyte subpopulations in pulmonary tuberculosis patients. **Mediators of Inflammation**, v.2, p.1-6, 2006.

DIEDRICH, C.R.; FLYNN, J.L. HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* Coinfection Immunology: How Does HIV-1 Exacerbate Tuberculosis? **Infection and Immunity**, v.79, n.4, p.1407-1417, 2011.

DIELI, F.; IVANYI, J.; MARSH, P.; WILLIAMS, A.; NAYLOR, I.; SIRECI, G.; CACCAMO, N.; SANO, C.D.; SALERNO, A. Characterization of lung  $\gamma\delta$  T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gueérin. **Journal of Immunology**, v.170, p.463-469, 2003.

DOMAGAŁA-KULAWIK, J.; MASKEY-WARZECHOWSKA, M.; HERMANOWICZ-SALAMON, J. Expression of macrophage surface markers in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of physiology and pharmacology**, v.57, Suppl 4, p.75-84, 2006.

DIVE – **Diretoria de Vigilância Epidemiológica**. Setor de Tuberculose, 2009. Disponível em: < <http://www.dive.sc.gov.br>>. Acesso em: jan/2014

EFTHIMIADIS, A., PIZZICHINI, E., PIZZICHINI, M. M. M., HARGREAVE, F. E. (1997). **Sputum examination for indices of airway inflammation: laboratory procedures**. Canadian Thoracic Society; Astra Draco AB, Lund, Sweden, 1997.

ERNST, J.D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews**, v.12, p581-591, 2012.

EUM, S.Y.; KONG, J.H.; HONG, M.S.; LEE, Y.J.; KIM, J.H.; HWANG, S.H.H.; CHO, S.N.; VIA, L.E.; BARRY III, C.E. Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients With Active Pulmonary TB. **Chest**, v.137, n.1, p.122-128, 2010.

FALKINHAM, J. O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. **Journal of applied microbiology**, v.107, n.2, p. 356-367, 2009.

FLYNN, J.L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v.19, p.93-129, 2001.

FRIEDMAN H, NEWTON C, KLEIN TW. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.209, 2003.

FU, L.M.; SOHASKEY, C.D.; JONES, B. Sputum Expectoration as a Useful non-Invasive Alternative to Bronchoalveolar Lavage for Collecting Human Alveolar Macrophages in Tuberculosis Research. **Science Journal Of Clinical Medicine**, v. 2, n.3, p. 92-97, 2013.

GETAHUN, H.; GUNNEBERG, C.; GRANICH, R.; NUNN, P. HIV Infection–Associated Tuberculosis: The Epidemiology and the Response. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, suplement.3, suplement.201-207, 2010.

GONÇALVES, B. D.; CAVALINI, L. T.; VALENTE, J. G. Monitoramento epidemiológico da tuberculose em um hospital geral universitário. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36, n.3, p. 347-355, 2010.

GUTIERREZ, R. S.; SANTOS, B.R.; ESPINA, C. A. A.; AZAMBUJA, H. C. P.; SILVA, L. C. C. Tuberculose. *In*: SILVA, L. C. C. **Condutas em pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.412-444.

HARGREAVE, F.E. Induced sputum for the investigation of airway inflammation: evidence for its clinical application. **Canadian Respiratory Journal**, v.6, p.169–174, 1999.

HIJJAR, M.A.; PROCÓPIO, M.J. Tuberculose – Epidemiologia e controle no Brasil. **Revista do Hospital Universitário de Pedro Ernesto (UERJ)**, ano 5, 2006.

HIRAKATA, V.N.; CAMEY, S.A. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v.29, n.3, p.261-268, 2009.

HUDOLIN, V. Medical Consequences of Alcoholism. **Annals of the New York Academy of Science**, v.252, p.353-364, 1975.

IREDALE, M. J.; WANKLYN, S. A.; PHILLIPS, I. P.; KRAUSZ, T.; IND, P.W. Non-invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. **Clinical & Experimental Allergy**, v.24, p.940-945, 1994.

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

KERKHOFF, A.D.; WOOD, R.; LOWE, D.M.; VOGT, M.; LAWN, S.D. Blood neutrophil counts in HIV-infected patients with pulmonary tuberculosis: association with sputum mycobacteria load. *Plos One*, v. 8, n.7, p.1-8, 2013.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L.A.B.; NETEA, M.G.; CREVEL, R.V. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2011, ID 405310, p. 1-12, 2011.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, p.467-476, 2004.

KRITSKI, A.; MELO, F.A.F. Tuberculosis in Adults. *In*: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007.

KWAN, C.K.; ERNS, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p. 351-376, 2011.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEIJA, G.I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. 1.ed. European Commission, International Cooperation for Developing Countries, 2004. Disponível em:

<<http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/foreword.pdf>>.  
Acesso em: set/2013.

LEÃO, S.C.; PORTAELS, F. *In*: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007.

LECKIE, M.J.; JENKINS, G.R.; KHAN, J.; SMITH, S.J.; WALKER, C.; BARNES, P.J.; HANSEL, T.T. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>). **Thorax**, v.58, p.23-39, 2003.

LIM, H.J.; PARK, J.S.; CHO, Y.J.; YOON, H.I.; PARK, K.U.; LEE, C.T.; LEE, J.H. CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells in drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. **Tuberculosis**, v.93, p.523-528, 2013.

LINDEN, A.; LAAN, M.; ANDERSON, G.P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **European Respiratory Journal**, v. 25, p.159–172, 2005.

LIN, H.H.; EZZATI, M.; MURRAY, M. Tobacco Smoke, Indoor Air Pollution and Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos Medicine**, v.4, n.1, p.173-189, 2007.

LOBUE, P.A.; ENARSON, D.A.; THOEN, T.C. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.14, n.10, p.1226-1232.

LOCKHART, E.; GREEN, A.M.; FLYNN, J.A. IL-17 Production Is Dominated by gdT Cells rather than CD4 T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection, **Journal of Immunology**, v.177, p.4662-4669, 2006.

LÖNNROTH, K.; WILLIAMS, B.G.; STADLIN, S.; JARAMILLO, E.; DYE, C. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis – a systematic review. **BMC Public Health**, v.8, p.289-300, 2008.

LOPES, T.; GOMES, C.; DIOGO, N. Tuberculosis unit: study of 10 years of activity (1999-2009). **Revista portuguesa de pneumologia**, v.17, n.6, p.266-271, 2011.

LOPPOW, D.; BÖTTCHER, M.; GERCKEN, G.; MAGNUSSEN, H.; JÖRRES, R.A. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. **European Respiratory Journal**, 16, p.324-329, 2000.

LOURENÇO, O.; FONSECA, A.M.; TABORDA-BARATA, L. T cells in sputum of asthmatic patients are activated independently of disease severity or control. **Allergologia et Immunopathologia**, v.37, n.6, p.285-292, 2009.

LOWE, D.M.; REDFORD, P.S.; WILKINSON, R.J.; O'GARRA, A.; MARTINEAU, A.R. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? **Trends in Immunology**, v.33, n.1, p.14-25, 2012.

MATTOS, I.G.; RIBEIRO, M.O.; NETTO, I.C.O.; AZEVEDO, P.A. Tuberculosis: A Study of 111 Cases in the Area of High Prevalence in the Extreme South of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.194-198, 2006.

MONTI, J.F.C. Perfil epidemiológico, clínico e evolutivo da tuberculose na região de Baurú, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, p.99-100, 2000

MOORE A.V.; KIRK, S.M.; CALLISTER, S.M.; Safe determination of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to antimycobacterial agents by flow cytometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.3, p.479-483, 1999.

MOUTINHO, I.L.D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v.21, n.1, p.42-48, 2011.

MUNAWWAR, A.; SINGH, S. AIDS associated tuberculosis: A catastrophic collision to evade the host immune system. **Tuberculosis**, v.92, p.384-387, 2012.

NANDI, B.; BEHAR, S. Regulation of neutrophils by interferon- $\gamma$  limits lung inflammation during tuberculosis infection. **Journal of Experimental Medicine**, v.208, n.11, 2011

NEONAKI, I.K.; GITTI, Z.; KRAMBOVITIS, E.; SPANDIDOS D. A.Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.1-11, 2008.

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

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, 2000.

NOGUEIRA, C.L. *Diagnóstico e epidemiologia molecular de cepas de Mycobacterium tuberculosis no Estado de Santa Catarina*. 2012. 139f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

O’GARRA, A.; REDFORD, P.S.; MCNAB, F.W.; BLOOM, C.I.; WILKINSON, R.J.; BERRY, M.P.R. The immune response in tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v.31, p.475-527, 2013.

PALMERO, D.J. Tuberculosis and HIV/Aids. *In*: PALOMINO, J. C.; LEAO, S.C.; RITACCO,V. *In*: PALOMINO, J. C.; LEAO, S.C.; RITACCO,V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007. Disponível em: <<http://www.tuberculosis-textbook.com>>. Acesso em: set/2013.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A.S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Mechanisms of Disease**, v.328, n.5, p.327-335, 1993.

PASSING, H.; BABLOK, W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods – Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.21, p.709-720, 1983.

PATEL, A. K.; THAKRAR, S. J.; GHANCHI, F. D. Clinical and laboratory profile of patients with TB/HIV coinfection: a case series of 50 patients. **Lung India**, v.28, n.2, p. 93-96, 2011.

PATHAN, A.A.; WILKINSON, K.A.; WILKINSON, R.J.; LATIF, M.; MCSHANE, H.; PASVOL, G.; HILL, A.V.; LALVANI, A. High frequencies of circulating IFN secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis* infected subjects without disease. **European Journal of Immunology**, v.30, p.2713–2721, 2000

PEDNEKAR, M.S.; HAKAMA, M.; GUPTA, P.C. Tobacco use or body mass - do they predict tuberculosis mortality in Mumbai, India? Results from a population-based cohort study. **Plos One**, v.7, n.7, p.1-8, 2012.

PHILIPS, J.A.; ERNST, J.D. **Tuberculosis Pathogenesis and Immunity**, v.7, 353-384, 2012.

PIN, I., GIBSON, P.G.; KOLENDOWICZ, R.; GIRGIS-GABARDO, A.; DENBURG, J.A.; HARGREAVE, F.E.; DOLOVICH, J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. **Thorax**, v.47, p.25–29, 1992.



PIZZICHINI, E.;PIZZICHINI, M.M.; EFTHIMIADIS, A.; EVANS, S.; MORRIS, M.; SQUILLACE, D.; GLEICH, G.J.; DOLOVICH, J.; HARGREAVE, F.E. Indices of Airway Inflammation in Induced Sputum:Reproducibility and Validity of Cell and Fluid-Phase Measurements. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.154, p.308-317, 1996.

POLLICE, A.A.; MCCOY, J.P.; SHACKNEY, S.E.; SMITH, C.A.; AGARWAL, J.; BURHOLT, D.R.; JANOCKO, L.E.; HORNICEK, F.J.; SINGH, S.G.; HARTSOCK, R.J. Sequential Paraformaldehyde and Methanol Fixation for Simultaneous Flow Cytometric Analysis of DNA, Cell Surface Proteins, and Intracellular Proteins. **Cytometry**, v.13, p.432-444, 1992.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O. Health impacts of environmental mycobacteria.**Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p. 98-106, 2004.

PUI, M.; LAY, J.C.; ALEXIS, N.E.; CARLSTEN, C.Flow cytometry to identify leukocyte subpopulations in blood and induced sputum in asthmatic and healthy volunteers exposed to diesel exhaust. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v.6, suppl.3, 2010.

RAJA, A. Immunology of Tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p-213-232, 2004.

RAMACHADRAN, R.; PARAMASIVAN, C.N. What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part 1: Techniques for diagnosis of tuberculosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, v.50, p.133-141, 2003

RAMOS, R. R. C. M.; GORELIK, V. L. B.; KRISTENSE, C. H. Avaliação Quanto ao Uso de Substâncias Psicoativas e Comorbidades Psiquiátricas de Uma População Internada para Tratamento de Tuberculose. **Revista da Graduação – PUC-RS**, v. 3, n.1, 2010.

REHM, J.; SAMOKHVALOV, A. V.; NEUMAN, M. G; ROOM, R.; PARRY, C.; LÖNNROTH, K.; PATRA, J.; POZNYAK, V.; POPOVA, S. The association between alcohol use, alcohol use disorders and

tuberculosis (TB). A systematic review. **BMC Public Health**, v. 9, n. 450, 2009.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 294-380, 2002.

ROSSETI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.4, p. 525-532, 2002.

RUDOLF-OLIVEIRA, R.C.M. *Determinação dos valores de referência das populações linfocitárias em sangue periférico de indivíduos adultos*. 2013. 175 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)– Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2013

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

SALEEB, P.; OLIVIER, K.N. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease: New Insights into Risk Factors for Susceptibility, Epidemiology, and Approaches to Management in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. **Current Infectious Disease Reports**, v.12,n.2, p. 198-203, 2010.

SANTOS, J.S.; BECK, S.T. A coinfeção tuberculose e HIV: um importante desafio- Artigo de revisão. **RBAC**, v.41, n.3, p.209-215, 2009.

SHARMA,S.K.;MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **The Indian Journal of Medical Research**, v.120.n.4, p. 316-353, 2004.

SHEATS, R.D.; PANKRATZ, V.S. Common statistical tests. **Seminars in Orthodontics**, v.8, n.2, p.77-86, 2002.

SILVA, R.M.; HUSEIN, R.A.M.M.; BAZZO, M.L; CHAGAS, M. Qualidade de amostras de escarro: análise comparativa da técnica de

Gram e da contagem diferencial de células. **Pulmão RJ**, v. 18, n.1, p.2-7, 2009.

SILVA, R.M.; ROSA, L.; LEMOS, R.N. Alterações radiográficas em pacientes com a co-infecção vírus da imunodeficiência humana/tuberculose: relação com a contagem de células TCD4<sup>+</sup>. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.32, n.3, p.228-233, 2006.

SILVA, R.M.; STOCCO, P.; BAZZO, M.; CHAGAS, M. Sputum cellularity in pulmonary tuberculosis: A comparative study between HIV-positive and -negative individuals. **Journal of AIDS and HIV Research**, v.2, n.2, p.17-23, 2010.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nature Review Immunology** v.2, p. 372–377, 2002.

STAPLES, K.J.; HINKS, T.S.C.; WARD, J.A.; GUNN, V.; SMITH, C.; DJUKANOVI, R. Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: Overexpression of CCL17. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.130, n.6, p.1404-1412, 2012.

STEWART, J.C.; VILLASMIL, M.L.; FRAMPTON, M.W. Changes in Fluorescence Intensity of Selected Leukocyte Surface Markers Following Fixation. **Cytometry Part A**, v. 71A, p.379–385, 2007.

SUTHERLAND, J.S.; YOUNG, J.M.; PETERSON, K.L.; SANNEH, B.; WHITTLE, H.C.; ROWLAND-JONES, S.L.; ADEGBOLA, R.A.; JAYEAND, A.; OTA, M.O.C. Polyfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Responses to Tuberculosis Antigens in HIV-1-Infected Patients before and after Anti-Retroviral Treatment. **Journal of Immunology**, v.184, p.6537-6544, 2010.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L. JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. (Eds): **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. International Agency for research on Cancer (IARC): Lyon, 2008. 4th.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, B. T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 175-178, 1993

TOOSSI, Z. Virological and Immunological Impact of Tuberculosis on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.1146-1155, 2003.

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

TORRADO, E.; ROBINSON, R.T.; COOPER, A.M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends in Immunology**, v.32, n.2, p.66-72, 2011.

TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. **Clinical Microbiology and Infections**, v.15, p. 906-910, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. São Francisco (CA): Pearson. 9 ed., 2009.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; SMITH, K.D.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.25, p. 14459–14463, 1999.

VEENSTRA, H.; BAUMANN, R.; CARROLL, N.M.; LUKEY, P.T.; KIDD, M.; BEYERS, N.; BOLLIGER, C.T.; van HELDEN, P.D.; WALZL, G. Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3<sup>dim</sup>CD56<sup>+</sup> natural killer T cells in fast treatment responders. **Clinical and Experimental Immunology**, v.145, p.252-260, 2006

VIDAL, S; BELLIDO-CASADO, J.; GRANELB, C.; CRESPO, A.; PLAZA, V.; JUÁREZ, C.; Flow cytometry analysis of leukocytes in

induced sputum from asthmatic patients. **Immunobiology**, v.217, p.692–697, 2012.

VIRGO, P.F.; GIBBS, G.J. Flow cytometry in clinical pathology. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.49, p.17–28, 2012.

VON SCHEELE, I.; LARSSON, K.; DAHLÉN, B.; BILLING, B.; SKEDINGER, M.; LANTZ, A.S.; PALMBERG, L. Toll-like receptor expression in smokers with and without COPD. **Respiratory Medicine**, v.105, p.1222-1230, 2011.

WAARD, J.H.; ROBLEDO, J. Conventional Diagnostic Methods. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007.

WANG H, YU M, OCHANI M, AMELLA CA, TANOVIC M, SUSARLA, S.; LI, J.H.; WANG, H.; YANG, H.; ULLOA, L.; AL-ABED, Y.; CZURA, C.J.; TRACEY, K.J. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v.421, p.384–388, 2003.

WELIN, A. *Survival strategies of *Mucobacterium tuberculosis* inside the human macrophage*. 2011. 90 f. Dissertação (Doutorado) – Linköping University, 2011.

WHO. World Health Organization, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, and United Nations Office of Drugs and Crime. **Policy guidelines for collaborative TB and HIV services for injecting and other drug users—an integrated approach**, 2008.

WHO - World Health Organization. **A guide to monitoring and evaluation for collaborative TB/HIV activities**, 2009. Disponível em: <[http://www.who.int/hiv/pub/tb/hiv\\_tb\\_monitoring\\_guide.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/tb/hiv_tb_monitoring_guide.pdf)>. Acesso em: jan/2014.

WHO – World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**, 2011. Disponível em:

<[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf)>.  
Acesso em: jan/2014

WHO – World Health Organization. **Global tuberculosis Report 2013**, 2013. Disponível em:<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf)>. Acesso em: dez/2013.

WILDNER, L.M. *Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas em Laboratório e Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina*. 2012. 150f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

WILLIAMS, K. J.; LING, C. L.; JENKINS, C.; GILLESPIE, S. H.; McHUGH, T. D. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.598-602, 2007.

WILSON, M. L. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and drug resistance. **Medical Microbiology**, v.52, n.11, p. 1350-1355, 2011.

XI, X.; HAN, X.; LI, L.; ZHAO, Z. Identification of a New Tuberculosis Antigen Recognized by  $\gamma\delta$  T Cell receptor. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.20, n.4, p.530-539, 2013.

## ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Comparação da Resposta Imune Celular Pulmonar entre Indivíduos Soro Positivos e Soro Negativos ao HIV com Tuberculose Pulmonar

**Pesquisador:** Maria Cláudia Santos da Silva

**Área Temática:** Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 3

**CAAE:** 03668012.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 315.502

**Data da Relatoria:** 08/07/2013

#### Apresentação do Projeto:

"Comparação da Resposta Imune Celular Pulmonar entre Indivíduos Soro Positivos e Soro Negativos ao HIV com Tuberculose Pulmonar" é o trabalho de Pâmela C. Gaspar sob a orientação de Maria Cláudia Santos da Silva. A amostragem: Serão utilizadas amostras de escarro coletadas de acordo com as normas do Ministério da Saúde, provenientes de doadores

voluntários admitidos Hospital Nereu Ramos e Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, ambos em Florianópolis (SC), e que concordarem em participar do estudo após terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Será realizado um estudo de corte no qual se analisará, no mínimo, 121 amostras de escarro de indivíduos HIV positivos e 121 de indivíduos HIV negativos, de acordo com o cálculo amostral. Uma parte de cada amostra será utilizada para o cultivo das micobactérias. Posteriormente as micobactérias serão congeladas e utilizadas para estudos futuros. Outra parte da amostra será utilizada para citometria de fluxo. Para a padronização da técnica de Citometria de Fluxo serão utilizadas amostras de sangue periférico e de escarro de doadores voluntários admitidos no Hospital Universitário da UFSC e que também concordaram em participar do estudo

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-000

**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS

**Telefone:** (48)3721-0208

**Fax:** (48)3721-0996

**E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 315.502

após assinarem o TCLE.

**Objetivo da Pesquisa:**

Investigar o fenótipo das células mononucleares no escarro de pacientes com tuberculose pulmonar e comparar os resultados entre os indivíduos soro positivos e soro negativos ao HIV. \* Analisar o fenótipo da células mononucleares do escarro de indivíduos:- Virgem de tratamento (ao diagnóstico), recidivados ou que abandonaram o tratamento há mais de 3 meses;- Após 30 dias de tratamento - Após 6 meses de tratamento \* Comparar os dados encontrados entre indivíduos soro positivos e soro negativos ao HIV.\* Comparar a celularidade do escarro com a resposta ao tratamento nos dois grupos em estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O desconforto do teste e os benefícios inerentes à pesquisas;

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é de relevância social e de saúde pública.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram atendidos os requisitos legais. Os dois pontos que apresentaram incoerências na redação foram satisfeitos.

**Recomendações:**

Nenhuma recomendação é necessária.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram satisfeitas e a recomendação é pela aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-0208 Fax: (48)3721-0696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 315.502

FLORIANOPOLIS, 25 de Junho de 2013

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br



## **ANEXO B - TCLE ESCARRO**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título da pesquisa: Comparação da Resposta Imune Celular Pulmonar entre Indivíduos Soro Positivos e Soro Negativos ao HIV com Tuberculose Pulmonar.**

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

#### **QUAL OBJETIVO DESTES ESTUDO?**

Investigar o fenótipo das células mononucleares no escarro de pacientes com tuberculose pulmonar e comparar os resultados entre os indivíduos soro positivos e soro negativos ao HIV.

#### **EU TENHO QUE PARTICIPAR?**

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar, de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) receberá.

#### **EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?**

Não existem risco e, com relação ao desconforto, o único desconforto que o senhor(a) terá será apenas a coleta de uma amostra de

escarro, a qual deverá ser realizada da mesma maneira que coletou para exames laboratoriais anteriormente realizados.

### **QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?**

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente com os resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhor compreensão da celularidade pulmonar envolvida na defesa do organismo durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e nos casos de coinfeção tuberculose/HIV, buscando-se, conseqüentemente, a otimização do sucesso da resposta ao tratamento da tuberculose.

### **TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR?**

Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) Senhor(a) não terá algum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra de escarro durante sua visita rotineira a um centro de saúde.

### **MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?**

Todos os dados pessoais do(a) Senhor(a) (nome, endereço, telefone) serão sigilosos (não serão divulgados). Os resultados dos testes laboratoriais somente serão utilizados para esta pesquisa e farão parte de grupos de resultados os quais serão estudados e analisados pelos pesquisadores do presente estudo.

### **COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?**

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: (048)  
3721-8146 (Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias)  
E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Pesquisadora: Pâmela Cristina Gaspar Fone: (048) 3721-8146  
(Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias)  
E-mail: pam.gaspar@yahoo.com.br

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ confirmo que:

1. Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;
2. Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;
3. Estou ciente de que doarei uma amostra de escarro, a qual será destinada para a pesquisa.
5. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
6. Concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante                      Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Nome do entrevistador                      Assinaturado entrevistador

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



## **ANEXO C – TCLE SANGUE PERIFÉRICO**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título da pesquisa: Padronização da técnica de citometria de fluxo para o estudo que envolve a **Comparação da Resposta Imune Celular Pulmonar entre Indivíduos Soro Positivos e Soro Negativos ao HIV com Tuberculose Pulmonar.**

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

#### **QUAL OBJETIVO DESTES ESTUDO?**

Padronizar a técnica de citometria de fluxo para a investigação do fenótipo das células mononucleares no escarro de pacientes com tuberculose pulmonar e comparação os resultados entre os indivíduos soro positivos e soro negativos ao HIV.

#### **EU TENHO QUE PARTICIPAR?**

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar, de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) receberá.

## **EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?**

Não existem risco e desconforto, pois o senhor(a) apenas doará uma amostra de sangue periférico, a qual será coletada juntamente com as outras amostras de sangue periférico para seus exames laboratoriais, ou seja, não haverá a necessidade de uma nova perfuração.

## **QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?**

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente com os resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir para a padronização de uma técnica que futuramente poderá fornecer uma melhor compreensão da celularidade pulmonar envolvida na defesa do organismo durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e nos casos de coinfeção tuberculose/HIV, buscando-se, consequentemente, a otimização do sucesso da resposta ao tratamento da tuberculose.

## **TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR?**

Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) Senhor(a) não terá algum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra de sangue durante sua visita rotineira a um centro de saúde.

## **MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?**

Todos os dados pessoais do(a) Senhor(a) (nome, endereço, telefone) serão sigilosos (não serão divulgados). Os resultados dos testes laboratoriais somente serão utilizados para esta pesquisa e farão parte da padronização da técnica de citometria de fluxo para escarro.



## **COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?**

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva Fone: (048) 3721-8146 (Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias)  
E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Pesquisadora: Pâmela Cristina Gaspar Fone: (048) 3721-8146 (Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias)  
E-mail: pam.gaspar@yahoo.com.br

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_ confirmo que:

1. Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;
2. Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;
3. Estou ciente de que doarei uma amostra de sangue periférico, a qual será destinada para a pesquisa.
5. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
6. Concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Nome do entrevistador

\_\_\_\_\_  
Assinaturado entrevistador

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