UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

ROSALINA GUEDES DONATO SANTOS

Orientadora: Songeli Menezes Freire

PERFIL DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR A ESTÍMULOS *IN VITRO* DE ANTÍGENOS *DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Salvador, BA

28 de Outubro de 2015

ROSALINA GUEDES DONATO SANTOS

PERFIL DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR A ESTÍMULOS *IN VITRO* DE ANTÍGENOS *DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Prof. Dr. Songeli Menezes Freire

Salvador, BA
28 de Outubro de 2015

Dedico este trabalho aos meus pais , Rosinete Guedes e José Rodrigues que sempre se empenharam pela minha educação e me forneceram subsídios para que pudesse trilhar o caminho da pesquisa e da docência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jeová Deus que me fortaleceu e me deu coragem e fé para seguir em frente.

Agradeço à minha orientadora Prof. Songeli por toda a dedicação e confiança demonstrados ao longo da orientação desse trabalho.

Agradeço a meu esposo, Alex Barbosa, pelo amor, carinho e paciência ao longo desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Rosy e José Rodrigues pelo amor incondicional, pela paciência de entender a ausência mesmo quando presente.

Agradeço a minhá avó (*in memorian*) pelas palavras de força nos momentos mais difíceis na execução desse trabalho.

Agradeço aos colegas outrora e agora amigos Marilda Casela, Maurício Campos, Terezita Bendicho , Geraldo Pedral pela ajuda e ombro amigo ao longo dessa jornada.

Agradeço aos estudantes de iniciação científica e mestrado em especial, Rogério, Mariana. Eula, Zunara, Samantha e Natália.

Agradeço aos funcionários do LABIMUNO pelo carinho.

Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.

Paulo Freire

RESUMO

Introdução: A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb),* ainda considerada um problema de saúde pública, porém, dados da Organização Mundial de Saúde (2014). O diagnóstico precoce desta doença e da infecção latente permanece difícil apesar da grande importância sócio-epidemiologica e econômica no acompanhamento clinico, terapêutico e na prevenção da TB. Na tuberculose a nutrição é considerada um fator diferencial para a recuperação do individuo. A compreensão de aspectos da imunopatologia e imunidade na infecção pelo Mtb tem sido ampliada com estudos realizados sobre a resposta do hospedeiro e a sequência de eventos inflamatórios desta patologia. As citocinas tem sido utilizada atualmente na compreensão da imunopatologia e no diagnóstico complementar desta infecção por diversos grupos. **Objetivo:** Descrever o Perfil de citocinas produzidas por indivíduos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* no kit comercial disponível de Ensaio de liberação de Interferon Gama (IGRA) para diagnóstico *in vitro* e analisar o efeito da glutamina (GLN) no modelo de resposta imune *in vitro*. **Materiais e Métodos:** Aprovado pelo Comite de Etica em Pesquisa, todos os participantes assinaram o termo de consentimento. Foram estudados nesta tese para os trabalhos participantes do estudo divididos em grupo de indivíduos sem infecção, PPD negativo, sem história de contato com pacientes com TB e grupo de indivíduos sintomáticos respiratórios com infecção pelo Mtb, com BAAR e ou cultura positivos, RX positivo. Todos os indivíduos foram triados em centros de referência para a tuberculose. O teste IGRA comercial (QTF-TB in tube e ELISA) Cellestis/Qiagen. A Glutamina (Dipeptiven) (40 mM), na concetração aproximada de uso de tratamento pacientes com necessidade de nutrição complementar. Foram

analisados *in vitro* a resposta celular por citocinas liberadas e pela expressão de marcadores de linfócitos totais e subpopulações linfocitárias T e B no modelo in vitro de estimulo por antígenos específicos e mitogenicos (teste IGRA) com suplementação com glutamina. **Resultados:** Conforme descrito em subitens no formato de três manuscritos os dados mostraram: O IGRA mostrou sensibilidade para o diangóstico precoce de infecção em contactantes domiciliares não evidenciados pelo PPD. Quanto á dosagens de citocinas o grupo com tuberculose demonstrou uma produção elevada de IFN-gama e uma produção mais baixa de IL-10, IL12 e IL-18. A sensibilidade do teste foi demonstrada pela curva ROC que demonstrou uma sensibilidade de 0.85 para IFN-gama do IGRA e 0.75 para o IFN-gama no CBA e 0.55 para todas as outras citocinas testadas nesse estudo. A produção de IFN-gama foi o biomarcador mais promissor para distinguir entre a TB ativa e latente na população vacinada. A expressão de marcadores celulares para linfócitos no estímulo com glutamina foi aumentada nos marcadores Cde3 e CD45 e para os outros marcadores linfocitários observou-se uma dimunuição no grupo com tuberculose **Conclusão:** A adição na glutamina *in vitro* demonstrou que há um aumento dos marcadores de superfície CD3 e CD45 bem como das citocinas IP-10 e IFN-gama. Diante disso pensa-se que a glutamina pode melhorar a resposta imune do paciente fazendo com que os pacientes com tuberculose ativa possam ter maiores sucessos na resolutividade da inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis is an infectious disease caused by Mycobacterium tuberculosis (Mtb) , still considered a public health problem, however, data from the World Health Organization (2014) . Early diagnosis of this disease and latent infection remains difficult despite the great socio- economic and epidemiological in clinical , therapeutic monitoring and prevention of TB . In nutrition tuberculosis is considered a differential factor for the recovery of the individual. An understanding of aspects of immunity and immunopathology in tuberculosis infection has been extended by studies on the host inflammatory response and sequence of events of this pathology. Cytokines has currently been used in understanding the immunology and complementary diagnosis of infection by various groups. **Objective:** To describe the cytokine profile produced BY individuals infected hair Mycobacterium tuberculosis no commercial kit available from Interferon Gamma Release Assay (IGRA) For in vitro diagnostic and analyze the effect of glutamine (GLN) no immune ANSWER model in vitro. Materials and Methods: Approved Hair Research Ethics Committee of All participants signed the consent form. Were studied this thesis paragraph OS Works participants study are divided into groups without infection individuals, negative PPD without contact history with Patients with TB and group of respiratory symptoms with hair infection Mtb, WITH AFB and Positive OR Culture, positive RX. All of the individuals screened Were Reference Centers paragraph tuberculosis. The commercial IGRA test (FTQ-TB and Pipe ELISA) Cellestis / Qiagen. Glutamine (Dipeptiven) (40 mM), at an approximate treatment concetração use Patients with necessity of supplementary nutrition. Were analyzed an in vitro cell RESPONSE IN released cytokines and expression markers By Totals lymphocytes and T lymphocyte subpopulations and B not in vitro model of

stimulation by specific antigens and mitogenic (IGRA test) with glutamine supplementation. **Results:** As described in sub-items in three manuscripts the data format shown: The IGRA showed sensitivity for early diangóstico infection in household contacts not evidenced by the PPD. The cytokine measurements with TB group showed high IFN-gamma production and a lower production of IL-10, IL12 and IL-18. The test sensitivity was demonstrated by the ROC curve that showed a sensitivity of 0.85 for IFN-gamma IGRA and 0.75 for IFN-gamma in the CBA and 0:55 for all other cytokines tested in this study. The production of IFN-gamma was the most promising biomarker for distinguishing between active and latent TB in the vaccinated population. The expression of cellular markers for lymphocytes in stimulating glutamine was increased in Cde3 and CD45 markers and others lymphocyte markers there was a dimunuição in the group with tuberculosis **Conclusion:** Adding the glutamine in vitro demonstrated that there is an increase in surface markers CD3 and CD45 as well as IP-10 and IFN-gamma cytokine. Thus it is believed that glutamine may improve the immune response of the patient causing the patients with active TB may have greater success in solving inflammation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAAR -	**Bacilos álcool-ácido resistente**
BCG -	Bacilo de Calmette e Guérin
CFP-10 –	Antígeno do filtrado de cultura de 10 KDA
CD183-	Receptor de quimiocina que se liga ao CXCL9
CXCL9 -	Quimioreceptor de células T
CXCL10-	Proteína indutora de IFN-gama
DPP-4 -	Dipeptidil peptidase
ESAT-6-	Antígeno secretado de 6 Kda
GLP-1	Peptideo semelhante ao glucagon
IGRA	Ensaio de Liberação de Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IFN-g	Interferon gama
IP-10	Regula produção de interferom gama pela proteína 10 Kda
LTBI -	Infecção latente
MIP-1 a/b	Proteína inflamatória do macrófago
Mtb	*Mycobacterium*
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
PPD	Derivado proteíco purificado
QuantiFERON®-TB Gold in Tube	Imunoensaio para a detecção da resposta linfocitária específica contra *Mycobacterium tuberculosis*

NK	Natural killer
QFT-IT	Quantiferon in tube
RD-1	Região de diferença
RT-23	Prova Tuberculínica Derivado Protéico Purificado – PPD **RT 23**
STOP TB	Parceria Brasileira Contra a Tuberculose
TB	Tuberculose
TB7.7.	Antígeno da região de diferença RD-5 do *Mycobacterium tuberculosis*
TST -	Teste tuberculínico
T-SPOT®.	Tipos de ELISPOT para diagnóstico da tuberculose pulmonar humana
UT -	Teste tuberculínico

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características demográficas e laboratoriais dos 191 indivíduos estudados

Tabela 02. Resultados das análises das citocinas plasmáticas realizadas por CBA em resposta ao estímulo do coquetel de antígenos do teste diagnostico in vitro de indivíduos com tuberculose ativa, latente e sem tuberculose pulmonar humana.

Tabela 01. Valores absolutos e relativos dos leucócitos totais do sangue periférico de indivíduos com tuberculose e sem a doença

Tabela 02 Número de células e média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais, helper , citotóxico e linfócitos B nos grupos controle e tuberculose.

Tabela 03 Número de células e média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais, helper , citotóxico e linfócitos B nos grupos controle e tuberculose

Tabela 04 Número de células e média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais, helper , citotóxico e linfócitos B nos grupos controle e tuberculose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* IGRA (QFT-TB) em a) IL-2 e em b) IL-8 nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por CBA Facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos

Figura 02 Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* IGRA (QFT-TB) em a) IL-6 e em b) TNF e em c) Linfotoxina nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por CBA facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

Figura 03 Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* **IGRA (QFT-TB)** em a) IFN-γ e em b) IL12p70 e em c) IFN-Y do kit comercial IGRA nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por **CBA** facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

Figura 04 Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* IGRA (QFT-TB) em a) IL-10 e b)

TGF-β nos grupos controle(N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante.Citocinas dosadas por CBA facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

Figura 01 Gráficos representativos utilizados na identificação das células sanguíneas por tamanho (FSC) e granulosidade/ complexidade (SSC) .No gráfico A os ´´gates´´ e no gráfico B a marcação para os linfócitos totais (CD 45- APC) gerados nos experimentos desse trabalho. Marcação para os linfócitos TCD4 no gráfico C (CD3 FITC e CD4 APC) , marcação para os linfócitos TCD8 no gráfico B (CD3 FITC e CD8 PE) e marcação para os linfócitos B descrito no gráfico C (CD19FITC e CD20 PE).

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01. Boxplot representativo das concentrações de citocinas dosadas por CBA (BD- array bead cytokines) no FACS CALLIBUR em a) IP-10 b) IFNgama c)TNF d) IL-4 e) IL-6 f) IL-10 no plasma de indivíduos com tuberculose ativa (N=14) e sem história de contato e sinais de tuberculose pulmonarhumana-PPD e IGRA negativo (N=09) pós estímulo com os antígenos inespecíficos (Phytohemaglutinine - PHA) e antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* . * p<0,05. As análises de comparação foram feitas utilizando o teste de Mann Whitney-U.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL 17
2.1 ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE 19
2.5.1 DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO E DA TB PULMONAR 20
2.5.2 Identificações de bacilos álcool ácidos resistentes 20
2.5.3 Cultura 21
2.5.4 Testes tuberculínico 21
2.5.5 Ensaios de Liberação de IFN-γ 23
2.5.6 Teste rápido moleculare (TRM) para identificação de mycobactérias 25
2.6 **EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO LATENTE E TUBERCULOSE** 26
2.8 **RESPOSTAS IMUNE E IMUNOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE** 29
2.8.1 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* 31
2.8.1.a IMUNIDADE INATA 31
2.8.1.b RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA 32
2.8.2 MODULADORES DA RESPOSTA IMUNE 36
2.8.3 Metabolismo da glutamina 37
2.8.4 METABOLISMO E CATABOLISMO DA GLUTAMINA DURANTE A DOENÇA / METABÓLICA, INFECCIOSA 40
2.8.5 A importância da glutamina nas células do sistema imune 42
2.8.6 Benefícios da glutamina 43
3.0 HIPÓTESE E OBJETIVOS 44
OBJETIVO GERAL 45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 45
4.1 RESULTADOS 47
ARTIGO 01:
The IGRA may be a predictor of pulmonary tuberculosis? 47
ARTIGO 02 58
Avaliação da produção de IL-2, IL-6, IL-8, TNF , LINFOTOXINA, IL-10, IFN-GAMA, IL12p70 E TGF-BETA em sangue periférico estimulado *in vitro* no teste diagnóstico da tuberculose de indivíduos adultos vacinados com BCG 58
ARTIGO 03 78
A GLUTAMINA PODE SER UM BOM IMUNOMODULADOR PARA A RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE? 78
4.0 CONCLUSÕES 100
LISTA COMPLETA DAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE 102

INTRODUÇÃO GERAL

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O complexo *Mycobacterium* é um agente etiológico constituído de outras espécies como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum e Mycobacterium microti* (BRASIL, 1999). O *Mycobacterium tuberculosis é* caracterizado como bacilo intracelular facultativo que sobrevive/replica no interior do fagossomono no macrófago. (Nasrin et *al*, 2000).

A tuberculose ainda é considerada um problema de saúde pública, porém, dados da Organização Mundial de Saúde (2014) mostraram que a tuberculose teve uma baixa na incidência de 1,5% entre os anos de 2000 e 2013 entre os países de maiores incidências da doença.

Mundialmente a taxa de mortalidade da tuberculose caiu 45% entre 1990 e 2013 e a taxa de prevalência caiu 41% durante o mesmo período. Entretanto novos progressos precisam ser feitos para alcançar as metas de parceria com o programa STOP TB que visa uma redução de 50% da doença até 2015. (Organização Mundial de Saúde 2014).

Os indivíduos com maior risco de desenvolver tuberculose doença incluem aqueles com infecção recente pelo *M. tuberculosis* e aqueles já infectados que apresentam condições clínicas favoráveis a progressão de infecção latente para TB doença. Indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* presentam risco aumentado de desenvolver TB doença especialmente nos dois primeiros anos após a infecção, com aproximadamente 90%

dos casos de TB secundária entre contatos ocorrendo neste período. (Morán-Mendoza *et al*2007).

A recomendação clínica para o diagnóstico da tuberculose são o Teste tuberculínico (TST) que indica se o indivíduo teve contato com o bacilo, baciloscopia que identifica a bactéria, cultura considerada padrão ouro e Raio-X. (Dorman 2010).

O diagnóstico da infecção latente (LTBI) representa um desafio para o controle da Tuberculose. Novos testes que detectam a produção de IFN-γ *in vitro* em resposta à liberação de antígenos presentes no complexo *Mycobacterium tuberculosis,* têm sido avaliados como testes mais sensíveis e específicos. Destes testes o IGRA tem sido alvo de interesse na prática clínica por apresentar algumas facilidades como resposta específica a antígenos da região de diferença do *Mycobacterium tuberculosis,* não necessitar de retorno para a leitura do teste, resposta em até 12 horas, positividade do teste compatível com a chance de risco de desenvolver a doença tuberculose e mais sensível e específico que o TST. (Trajman *et al*, 2013)

Neste trabalho foram avaliados aspectos da imunidade adaptativa celular com caracterização do perfil de resposta no modelo de estimulo celular in vitro utilizando um kit de diagnostico comercial disponível para tuberculose pulmonar humana.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O complexo *Mycobacterium* é composto por este agente etiológico e outras espécies como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum e Mycobacterium microti* (BRASIL, 1999). O *Mycobacterium tuberculosis é* caracterizado como bacilo intracelular facultativo que sobrevive/replica no interior do fagossomono no macrófago.(Nasrin et *all*, 2000). Geralmente o órgão mais acometido são os pulmões mas na forma mais grave a mesma pode se disseminar para outros órgãos.

Os sinais clínicos da tuberculose clássicos são febre, geralmente vespertina, sudorese noturna,indisposição,adinamia e perda de peso. O diagnóstico padrão ouro é a cultura do *Mycobacterium tuberculosis,* porém, a técnica mais utilizada é a pesquisa do bacilo no esputo e nos últimos anos vários estudos têm-se voltado para testes imunológicos.(Hisbello, 2006). As complicações pulmonares podem incluir hemoptise, pneumotórax, bronquiectasia, destruição pulmonar extensiva, neoplasia e aspergilose pulmonar crônica. (Pozniak 2015).

2.5.1 DIAGNOSTICO DA INFECÇÃO E DA TB PULMONAR

2.5.2 Identificações de bacilos álcool ácidos resistentes

A coloração para bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) pelo método de Ziehl-Neelsen é utilizada basicamente para micobactérias, que possuem uma parede celular constituída de ácidos micólicos resistente à descoloração por álcool-ácido. Essa coloração é o método mais rápido para detecção de micobactérias em amostras clínicas. Embora seja um exame rápido, baixo custo, com alta especificidade e elevado valor preditivo positivo no nosso meio, apresenta baixa sensibilidade (30% a 70%). Este método depende do paciente ser bacilífero e da quantidade de bacilos eliminados. Além disso, a amostra quando não bem coletada e/ou processada poderá originar resultados falsos negativos por isso recomenda-se a coleta de duas amostras de escarro espontâneo em potes plásticos descartáveis, uma no momento da consulta médica e outra pela manhã ao acordar. Indivíduos sem expectoração espontânea e raio x de tórax suspeito de TB devem ser submetidos a indução de escarro ou broncoscopia. A pesquisa de BAAR no escarro tem elevado valor preditivo positivo em nosso meio (> 95%) e não diferencia as espécies. Sua utilização está ligada ao controle da eficácia do tratamento (CAMPOS, 2006; SBPT, 2009).

2.5.3 Cultura

A cultura é o método considerado padrão ouro para o diagnóstico da tuberculose e permite a identificação e a realização do teste de sensibilidade. Os meios sólidos mais utilizados são o Lowenstein Jensen e Ogawa Kudoh, Apesar de sua importância, é um processo demorado, somente é possível detectar o crescimento do bacilo 4 a 6 semanas após a inoculação, há riscos de contaminação e nem sempre apresenta 100% de sensibilidade. Os sistemas automatizados BACTEC 460 TB ®, BACTEC 9000® são sistemas de detecção radiométrico, que utilizam o meio líquido Middlebrook 7H12, acrescido de ácido palmítico marcado com um radioisótopo do carbono 14 (14C). Durante o crescimento bacilar, o bacilo utiliza o ácido palmítico no seu metabolismo, liberando gás carbônico (14CO2), cuja concentração é convertida em unidades de crescimento pelo equipamento, indicando que houve crescimento bacteriano. Esses sistemas têm a vantagem de acelera o crescimento bacteriano o que torna possível a liberação do resultado em um menor tempo (10 a 15 dias), mas tem como limitação resultados falsos positivos devido à contaminação por outras bactérias e a cultura nem sempre apresenta 100% de positividade (ARAUJO et al*.,* 2008).

2.5.4 Testes tuberculínico

Na atualidade, o antígeno usado para este teste é uma fração proteica de baixo peso molecular composto de 200 proteínas obtidas de culturas do *Mycobacterium tuberculosis* que, em 1932, foi isolado por Florence Seibert (CLARICE ABRAMO *et al,*

2006). Essa fração proteica de baixo peso molecular foi denominada derivado proteico purificado (PPD) que, ao longo dos tempos, sofreu pequenas modificações para se tornar mais específica, e, hoje é o padrão internacional para o teste tuberculínico (VERONESI, 2005). No Brasil, o antígeno usado é chamado de RT23, um derivado da tuberculina de Seibert, aplicado na dose de duas unidades de tuberculina (2UT). Embora tenha importância no diagnóstico da tuberculose, o teste tuberculínico apresenta 80% de sensibilidade (porcentagem de indivíduos doentes com teste positivo) e especificidade (TEIXEIRA *et al.*, 2007; VERONESI, 2005, OMS/ANVISA 2009).

O teste tuberculínico é o diagnóstico de triagem *in vivo* no qual se utiliza a técnica de Mantoux, que consiste na injeção intradérmica de antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*, convencionalmente na face ventral do antebraço esquerdo. A injeção do antígeno tuberculínico é uma reação de hipersensibilidade tipo IV caracterizada por vasodilatação, edema e acúmulo de células inflamatórias. A leitura do antígeno injetado no braço é feita após 48 a 72 horas, onde se pode observar a formação de um nódulo, que corresponde à chamada resposta de hipersensibilidade tardia. O resultado do teste é expresso pela medida do maior eixo transversal deste nódulo, em milímetros, desprezando-se o eritema que se forma ao redor (VERONESI, 2005; SOARES *et al.*, 2004, O'SHEA *et al*2014).

A Organização Mundial de Saúde (2011) indica conversão tuberculínica quando ocorre a formação de uma pápula de pelo menos 10 mm em relação a primeira TST. Entretanto algumas condições técnicas podem gerar resultados falsos negativos como: tuberculina malconservada por temperatura inadequada e ou exposta à luz solar; contaminação da tuberculina com fungos, diluição errada, manutenção em frascos inadequados, desnaturação das proteínas, injeção profunda ou quantidade insuficiente; uso de

seringas e agulhas inadequadas; administração tardia em relação à aspiração na seringa e leitor inexperiente ou com vício de leitura. (Organização Mundial da Saúde 2014). Além disso, fatores biológicos também podem interferir no resultado como: tuberculose grave ou disseminada; doenças infecciosas agudas virais, bacterianas ou fúngicas; imunodepressão, neoplasias, especialmente de cabeça e pescoço e as doenças linfoproliferativas; desnutrição, diabetes mellitus, insuficiência renal e outras condições metabólicas; linfogranulomatose benigna ou maligna. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE 2014, PAI; MENZIES, 2009; RUFFINO-NETO, 2006).

Outros fatores que podem contribuem para diminuir a sensibilidade do teste são as reações cruzadas com antígenos de outras micobactérias ou pela repetição da aplicação do TST (ampliação de resultados subseqüentes por efeito *reforço "booster"),* ocorrendo em indivíduos com contato prévio com o agente ou com o antígeno. (VERONESI, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

2.5.5 Ensaios de Liberação de IFN-γ

Nos últimos anos o teste comercial de dosagem de interferon secretado *in vitro* por células do sangue após estímulos com antígenos proteicos da região gênica RD-1 de *Mycobacterium tuberculosis* (teste Quantiferon TB® Gold – Cellestis- Melbourne, Austrália) aumentam a especificidade e sensibilidade do teste (BROCK *et al*, 2006).

O IGRA contém os antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7. CFP-10 é capaz de aumentar a secreção de INF-γ; síntese frente a estímulos estressantes; aumento de produção de óxido nítrico e secreção de IL-10 e ESAT-6 é capaz de aumentar a produção de IFN-γ e TNF. (ARAUJO *et al.,* 2008)

Os IGRAs são testes às respostas imunológicas celulares para diagnóstico da infecção Tb latentes e têm sido usados como alternativo ao teste TST. Estão disponíveis comercialmente como o QuantiFERON®-TB Gold in Tube (Cellestis Limited, Carnegie, Austrália-QFT-IT) e T-SPOT®. TB (Oxford Immunotec, Abdingdon, UK). Evidências sugerem que os ensaios baseados na detecção de IFNγ têm um melhor desempenho que o PPD por apresentar uma maior especificidade, melhor correlação com a exposição ao Mtb e uma menor reação cruzada com a vacinação por BCG e infecções por outras micobactérias. Esses testes baseiam-se na detecção de INF-γ produzido por amostras de sangue periférico O T-SPOT®.TB utiliza células mononucleares de sangue periférico e detecta pelo uso de ELISPOT, o número de células T produtoras de INF-γ. O QuantiFERON®-TB Gold in Tube é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza peptídeos antigênicos que simulam proteínas micobacterianas simulando as proteínas *early secreted antigenic target* 6-kDa (ESAT-6), *culture filtrate protein* 10-kDa (CFP-10) e Tb7.7, cuja finalidade é estimular as células no sangue total heparinizado. A detecção de INF-γ pelo método ELISA é usada para detectar respostas *in vitro* a estes peptídeos antigênicos, os quais estão associados à infecção por Mtb. Estas proteínas estão ausentes de todas as cepas vacinais BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas, à exceção de *M. Kansaii*, *M. szulga*i e *M. marinum.* Indivíduos infectados com micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* normalmente têm linfócitos no sangue que reconhecem esses e outros antígenos micobacterianos. Esse processo de reconhecimento envolve a geração e secreção da citocina INF-γ. A detecção e quantificação de INF-γ constituem a base deste teste. Segundo a *Portaria* nº 2.690, de 5 de novembro de 2009, o ensaio de liberação de interferom gama foi liberado para uso em pesquisa e posteriormente para diagnostico o IGRA TB Gold in tube e o ELISA da marca QUANTIFERON - produzido pela Cellestis e posteriormente pela Qiagen.

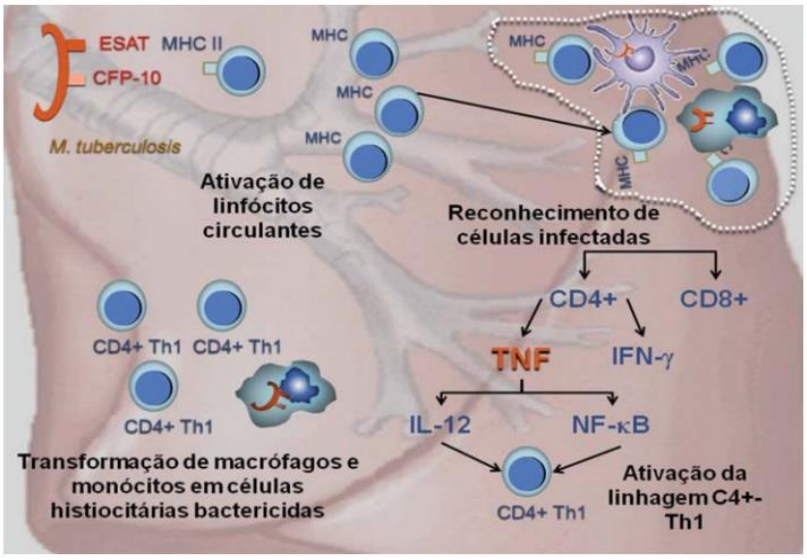


Figura 01- Resposta aos antígenos protéicos da região gênica RD-1 do *Mycobacterium tuberculosis*

Fonte: Investigação de infecção tuberculosa latente em pacientes com psoríase candidatos ao uso de drogas imunobiológicas. Anais Brasileiros Dermatologia.;86(4):716-24, 2011.

2.5.6 Teste rápido moleculare (TRM) para identificação de mycobactérias

O teste de amplificação dos ácidos nucléicos é utilizado para a detecção do complexo *M.tuberculosis* e para a triagem da resistência a rifampicina. Esse teste de baseia na purificação, concentração e amplificação dos ácidos nucléicos por reação de cadeia em polimerase (PCR) em tempo real. Tem como principal vantagem à integração e

automatização dos três processos (preparação da amostra biológica, amplificação e detecção) o que facilita, pois dispensa a criação de um local exclusivo para realizar a técnica. Além dessa vantagem temos o resultado de 24-48 horas. (Van et al, 2010). A sensibilidade dos testes moleculares é de 92% enquanto que a cultura é 81% e a baciloscopia 65%. (Boehme et al 2010).

2.6 **EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO LATENTE E TUBERCULOSE**

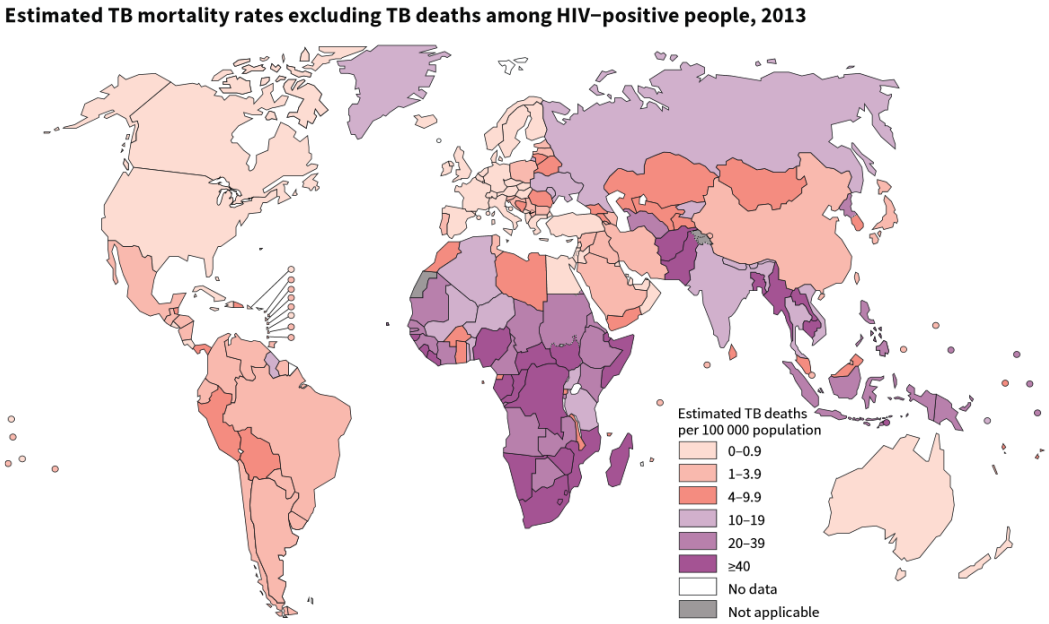
A tuberculose ainda é considerada um problema de saúde pública, porém, dados do último Report. (2014) mostraram que a tuberculose teve uma baixa na incidência de 1,5% entre os anos de 2000 e 2013 entre os países de maiores incidências da doença. Mundialmente a taxa de mortalidade da tuberculose caiu 45% entre 1990 e 2013 e a taxa de prevalência caiu 41% durante o mesmo período como mostra a figura 01. Entretanto novos progressos precisam ser feitos para alcançar as metas de parceria com o programa STOP TB que visa uma redução de 50% da doença até 2015. (Organização Mundial de Saúde 2014).

A estratégia global para a diminuição da incidência da tuberculose foi o *STOP TB* que tinha como objetivos norteadores: alcance mundial de acesso a programas de saúde, redução do sofrimento humano causado pelo ônus socioeconômico da TB, proteção das populações vulneráveis como pacientes com HIV, TB resistentes e apoio a novas pesquisas nesse campo. (WHO 2014).

Entretanto, para que essa meta seja alcançada são necessárias medidas de intervenção para os pacientes contatos que são definidos como indivíduos em contato com pacientes com TB pulmonar, contatos intradomiciliares ou pessoas que sejam expostas

ao contato por mais de 4 horas semanais. (Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar, 2011)

Figura 01. Estimativa de mortalidade excluindo coinfecção com HIV no período de 2013.



2.7 **VACINAÇÕES COM BCG**

A primeira Norma do Programa de Vacinação da Secretaria da Saúde Pública foi implantada em **1968** e recomendava a bacilo de Calmette e Guérin (BCG) por via oral: entre 3 e 7 dias de vida. Hoje essa vacina é administrada por via intradérmica para crianças de 0 a 4 anos. (Disponível em http://www.imuniza.com.br/noticiais_bcg.asp) . A vacina intradérmica tornou-se desde então amplamente aplicada em todo o mundo, indicada principalmente para prevenir as formas graves de tuberculose (miliar e meníngea) em crianças menores de cinco anos de idade, em crianças soropositivas para HIV e filhos de mães com AIDS, mesmo que apresentassem teste tuberculínico negativo e fossem assintomáticas (BRASIL, 2007).

No entanto, apesar disso, a capacidade da vacina BCG produzir proteção contra a tuberculose vem sendo amplamente discutida em vários pontos (FERREIRA *et al*., 2002; WEDLOCK *et al.*, 2007; ARANTES, 1980), tais como: capacidade de resposta dos indivíduos, extensa variabilidade de reações adversas pós-vacinais entre indivíduos submetidos à vacina; quantidade de vacina injetada, mutações na cepa utilizada na produção da BCG que podem alterar o poder imunizante (BRASIL,2007; ARANTES, 1980; ROSEMBERG, 2001; BENÉVOLO-DE ANDRADE *et al.*, 2005; Davidson *et al*2015).

2.8 **RESPOSTAS IMUNE E IMUNOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE**

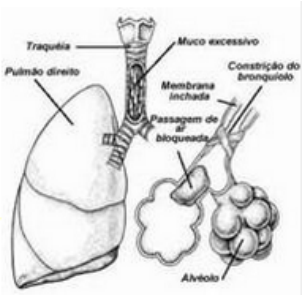
A via de entrada do *Mycobacterium tuberculosis* é o sistema respiratório. Uma vez que o indivíduo entra em contato com o *Mycobacterium tuberculosis* podem ocorrer três processos: 1) o hospedeiro elimina o agente por meio das barreiras físicas do sistema respiratório como por exemplo, a mucosa ciliada existente nos brônquios; 2) o indivíduo controla a infecção formando granulomas nos quais a bactéria pode permanecer durante vários anos, é o que denominamos de infecção latente e 3) desenvolvimento da doença ativa que cursa geralmente com o rompimento do granuloma (Nancy *et all*, 2009).

Após a infecção primária os macrófagos alveolares e o sistema complemento são responsáveis por reconhecer e fagocitar o *M. tuberculosis*. Para que a fagocitose ocorra receptores chaves estão envolvidos como o lipoarabinomannan, um receptor para os macrófagos. O sistema complemento atua ligando o C3 com a proteína da parede bacteriana, reconhecendo o *Mycobacterium,* opsonizando e apresentando ao macrófago. (Nancy, 2009). Após a fagocitose uma cascata de eventos são desencandeados como a produção de enzimas proteolíticas e citocinas na tentativa de matar o patógeno (Nancy, 2009). A produção das citocinas recrutam linfócitos T para o sítio da inflamação, atuando de 2 a 12 semanas. A quimioatração desses linfócitos T formam um granuloma na tentativa de limitar a replicação bacteriana. (Nicod, 2007). Esse ambiente é caracterizado por apresentar baixo pH, baixa quantidade de oxigênio e limitação de nutrientes o que garante a diminuição do crescimento bacteriano e a estabilização do estado de latência. (Nancy, 2009).

Infecção

Pessoa infectada tosse, espirra, fala pequenas partículas de saliva e muco são expelidas no ar

Inalação → Localização do MTB nos alvéolos fagocitose por macrófagos



Estágio infeccioso → Crescimento do MTB 2-12 semanas – 1.000 a 10000 microrganismos

Ativação do sistema imune – resposta imune celular → Detectado pelo teste da tuberculina

Sobrevivência e crescimento no interior de polimorfonucleares → Invasão de linfonodos e disseminção para sítios extracelulares

2.8.1 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

2.8.1.a IMUNIDADE INATA

A resposta do hospedeiro para a infecção depende de uma sequência de eventos inflamatórios importantes. Os neutrófilos e os macrófagos possuem um papel crítico na fase aguda da infecção e no link para a imunidade adquirida (Nasrin *et all*, 2000). Os polimorfonucleares agem fagocitando o *mycobacterium*, liberando espécies reativas de oxigênio e grânulos capazes de matar o *mycobacterium* (Majeed *et all* 1998, Nasrin *et all*, 2000).Além desses mecanismos os polimorfonucleares possuem moléculas capazes de matar o agente patogênico como defensinas, proteases e lactoferrina .E ainda podem exercer papel microbicida direto secretando quimiocinas (por exemplo, IP-10, MCP-1,MIP-1 a/b) e citocinas pró-inflamatórias como INF-gama e TNF em resposta ao agente microbiano (Daniel *et all*, 2008).

As células natural killer (NK) são linfócitos granulares do sistema imune inato que desempenham funções efetoras citotóxicas importantes. Estas células possuem grânulos associados a peptídeos capazes de combater o *M. tuberculosis* e ativar a apoptose por meio da interação Fas/FasLigante . A ação dessas células é controlado por citocinas como IL-12, IL-18 e *INF-γ* (Moreta *et all*, 2008).

2.8.1.b RESPOSTA IMUNE ADQUIRIDA

A resposta imune protetora contra M. *tuberculosis* pode ser definida como resposta celular do tipo TH1 com produção de *INF-γ* .

Após a fagocitose do *Mycobacterium,* o bacilo permanece no interior do fagossomo. A partir da fusão do fagossomo e do lisossomo, antígenos podem ser processados, e posteriormente apresentados aos linfócitos T auxiliadores ($CD4^+$), T helpers (Th), através do complexo principal de histocompatibilidade, de classe II, presente apenas em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Células $CD4^+$ do tipo 1 (Th1) desempenham a função principal na resposta imune à micobactéria.(Guermonprez *et al*,2003). Contudo, células T-citotóxicas ($CD8^+$), que reconhecem antígenos oriundos do citoplasma (tumorais ou virais), também participam da resposta imune ao *M. tuberculosis* (North RJ et al, 2004). Células T $CD8^+$ são capazes de reconhecer fragmentos peptídicos ligados ao MHC classe I, moléculas expressas em praticamente todas as células diferenciadas ou maduras do organismo. No caso da micobactéria, foi demonstrado que vesículas apoptóticas, oriundas de células infectadas e contendo antígenos do bacilo associados ao MHC classe I, são capazes de estimular, especificamente, células T CD8+. (Winau *et al*, 2006, Garra *et al* 2013). Alternativamente, em um fenômeno denominado apresentação cruzada, antígenos de patógenos intracelulares podem ter acesso direto à apresentação via MHC classe I, graças à capacidade dos fagossomos de se fundirem com o retículo endoplasmático, e do recrutamento de proteínas do retículo endoplasmático para o fagossomo. Desta forma, antígenos fagocitados podem ter acesso ao citoplasma, sofrer degradação por proteases, denominadas proteossomas, retornar ao fagossomo através de transportadores associados ao processamento de antígenos (TAP), e se ligar a

moléculas do MHC classe I situadas no fagossomo, levando à posterior expressão na superfície celular e ao reconhecimento pelas células $CD8^+$ (Houde *et al*, 2003).

Portanto, o sistema imune é capaz de reconhecer e responder efetivamente contra um amplo espectro de determinantes antigênicos de características bioquímicas diferentes. Neste reconhecimento, existe uma hierarquia entre as subpopulações de células T que contribuem na resposta imune à micobactéria, sendo os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ os de maior importância nessa hierarquia (Kaufmann *et al*, 2005).

A ativação dos linfócitos $CD4^+$ envolve o reconhecimento do peptídeo ligado ao MHC de classe II e a interação entre moléculas co-estimuladoras, como a interação CD80/CD86-CD28.

Além disso, citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos, como a interleucina (IL)-12, e citocinas produzidas pelos linfócitos T ativados, como a IL-2, estão envolvidas na ativação e proliferação dos linfócitos T. As citocinas, moléculas produzidas e secretadas por diferentes células imunocompetentes, após algum estímulo, são um componente central da defesa contra as micobactérias. Em todos os estágios da resposta imune, as citocinas produzidas participam dos processos regulatórios, assim como das funções efetoras (Guermonprez *et al*, 2003). O reconhecimento da micobactéria e posterior secreção de IL-12 por macrófagos são processos iniciados antes da apresentação de antígenos do *M. tuberculosis* aos linfócitos T. A IL-12 induz a produção de interferon-gama (IFN- γ) em células NK, na fase inicial da resposta imune, e também induz a ativação, diferenciação, produção de IFN- γ e expansão de células Th1 antígeno-específicas. A capacidade bactericida do macrófago frente ao *M. tubercolosis* necessita ser previamente ativada, e o IFN- γ é o principal e mais potente mediador desse processo (Ottenhoff et *al*, 1998; Salgame *et*

*al*2005). O INF-γ é capaz de potencializar a expressão de diversos genes no macrófago, induzir um aumento na expressão do MHC (aumento na apresentação de antígenos) e de receptores para imunoglobulinas (FcRs; maior capacidade de fagocitose), recrutar linfócitos T que participam da destruição bacteriana, e participar da produção de óxido nítrico. Embora a produção de IFN- γ isolada seja insuficiente para o controle do bacilo, o IFN- γ é um dos componentes cruciais para a resposta protetora contra o patógeno (Ottenhoff et al, 1998; Salgame *et al*2005). Embora a capacidade de produção de IFN- γ possa variar entre indivíduos, alguns estudos sugerem que os níveis de IFN- γ estão diminuídos em pacientes com TB ativa (Lin et al, 1996). Estes níveis estão ainda mais diminuídos em pacientes com doença pulmonar avançada (Ting et al,1999). IFN-γ também é capaz de induzir a proteína IP-10 também chamada CXCL-10. É uma quimiocina pro-inflamatória envolvida na migração leucocitária e na ativação de células T (Nolan *et al* 2013, TONBY *et al* 2015). Pode-se avaliar o receptor para IP-10 utilizando o marcador CD183 que é um receptor de quimiocina que se liga CXCL9, CXCL10, CXCL11. É um receptor de transmembrana da proteína G. CXCR3 é expresso em células do perfil T (Th1), células natural Killer (NK), células dendríticas, mastócitos, macrófagos alveolares, eosinófilos e células epiteliais das vias respiratórias humanas. São importantes para o recrutamento de linfócitos pós eventos inflamatórios. (KIM Y.J. PARK A.J. IM H.C*. et al*. 2014).

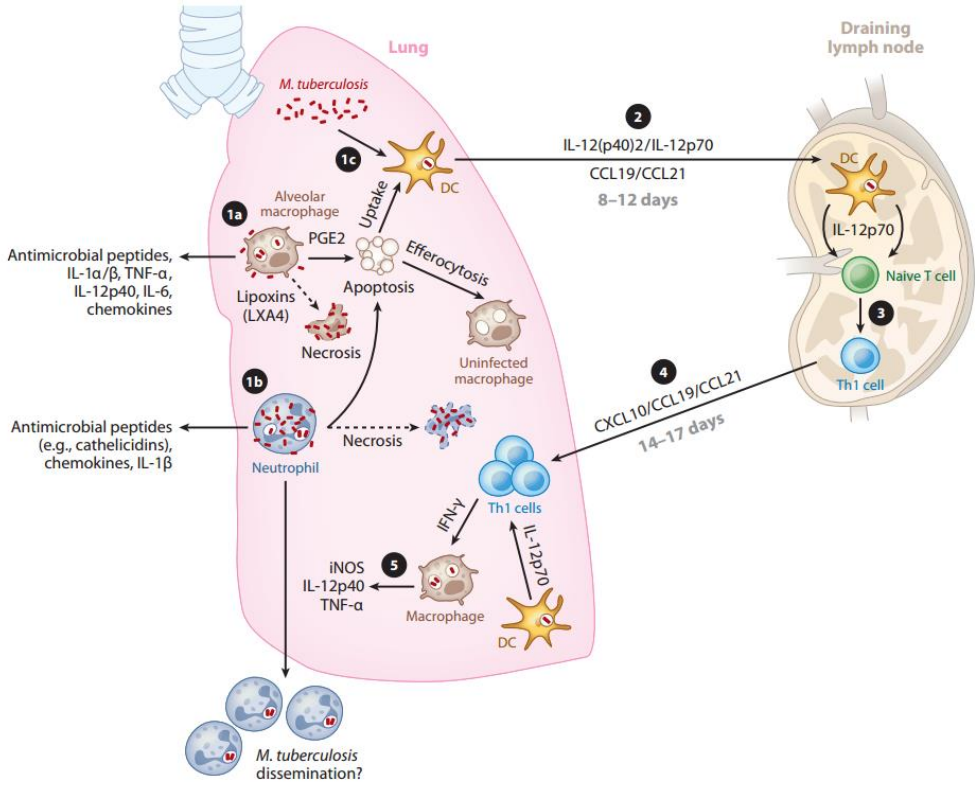


Figura 02. Uma visão geral da resposta imunológica

Fonte:The Immune Response in Tuberculosis. Annual Review. Immunology.Vol 31:475–527, 2013.

2.8.2 MODULADORES DA RESPOSTA IMUNE

A Imunomodulação é caracterizada pela capacidade de modular a resposta imune. Além de citocinas e fatores de crescimento, oligoelementos e aminoácidos essenciais e condicionalmente essenciais.

Glutamina e arginina são considerados aminoácidos essenciais com propriedades de imunomodulação. A glutamina protege a mucosa diminuindo a translocação bacteriana e faz *dowregulation* na resposta inflamatória intestinal pois é capaz de modular o fator de transcrição nuclear (NFkB) e a L-arginina atua via do óxido nítrico e atua na cicatrização vascular (Lecleire *et al* 2008).

A glutamina é um aminoácido não essencial e não tóxico consistindo de 5 cadeias de carbono e 2 resíduos de nitrogênio sendo o mais abundante aminoácido extracelular com concentração plasmática de aproximadamente 0,7 µM, o que corresponde a aproximadamente 50 % do pool de aminoácidos livres. É um aminoácido não essencial, sintetizado a partir das necessidades corporais sendo a forma mais abundante de aminoácido encontrada no corpo. Sua síntese é feita a partir do ácido glutâmico (a glutamina é a amida do ácido glutâmico), valina e isoleucina (Bill Philip, 1997). O metabolismo da glutamina acontece através de uma única reação catalisada por duas enzimas. A glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina fazendo a interação de glutamato e amônia, e a glutaminase faz a reação inversa. (Bill Philip, 1997,).

Os órgãos que estão envolvidos na síntese de glutamina são: músculo esquelético, pulmões, fígado, cérebro e possivelmente o tecido adiposo, que apresentam atividade da enzima glutamina-sintetase. Os tecidos que consomem a glutamina de forma mais

rápida são as células da mucosa intestinal, leucócitos e células do túbulo renal pois contêm elevada atividade da enzima glutaminase. Sob certas condições, tal como um reduzido aporte de carboidratos, o fígado pode tornar-se um sítio consumidor de glutamina. (Rogero *et al* 2003; Rowbottom *et al* 1996; Barni 2011).

2.8.3 Metabolismo da glutamina

A glutamina é metabolizada quase que exclusivamente por duas rotas, sendo a principal, a hidrólise a glutamato pela reação da glutaminase). O produto metabólico imediato da glutamina é o glutamato, um dos mais abundantes aminoácidos no fígado, rim, músculo e cérebro. Suas altas concentrações intracelulares em torno de 2 a 5 mol/L comparados às concentrações extracelulares que é de aproximadamente 0,05 mol/L, indicam seu importante papel em todos os tecidos.O glutamato é o centro da carga protéica diária e exerce um papel chave na transaminação e desaminação de aminoácidos, o que inclui a formação de aspartato, alanina e glutamina. O músculo esquelético libera glutamina e alanina em grandes quantidades representando 50 a 100 % do efluxo de aminoácidos em jejum e em estado alimentado (Figura 1), respectivamente, onde o glutamato é o aminoácido predominantemente captado (ver figura 04). O glutamato também está envolvido com o sistema glutamato/aspartato cuja importância se dá na produção de equivalentes de redução no citoplasma, como o NADH e também como substrato anaplerótico para o ciclo de Krebs quando desaminado a alfa cetoglutarato, além também de participar de processos relacionados à formação de óxido nítrico, uréia e GABA. Também é o principal neurotransmissor excitatório de mamíferos possuindo receptores no SNC, sendo os principais, os ionotrópicos. A

ativação excessiva destes receptores pode provocar neurotoxicidade com degeneração neuronal e morte celular. O outro passo para o metabolismo da glutamina é via transaminação ao seu alfa cetoácido, denominado alfacetoglutaramato que, subsequentemente, é hidrolisado a alfa cetoglutarato e amônia pela ação da –amidase. (Brosnan T.J 2000).

A rota metabólica para a ativação de linfócitos começa quando a glicose é retida nas células por fosforilação da glicose-6-fosfato por hexoquinases. (Ganeshan *et al* 2014). A glicose-6-fosfato entra na glicólise aeróbica e então é convertida em piruvato. O caminho seguinte pode ser a conversão em lactato, acetil COA ou ser ionizada. Cerca de 91% dos casos a glicose-6-fosfato é convertida em lactato e o produto restante é convertido em acetil COA, que desenvolve um papel chave na biogênese da membrana, atua como um precursor de fosfolipídeos, colesterol e triacilgliceol. O produto restante da glicose-6-fosfato é oxidada nos linfócitos (Curi *et al*1999; Ardawi *et al*1985 e Pearce *et al* 2013). Após, há retirada do citrato (piruvato convertido a acetil COA mais oxalacetato) provenientes do ciclo do ácido tricarboxilíco para reações biossintéticas e para continuar as reações biossintéticas há necessidade de metabólitos intermediários para continuar a manutenção do ciclo (Curi *et al* 1999). Além de fornecer intermediários para a manutenção do ciclo tricarboxicílico por usar o gluatamato, os linfócitos também convertem a glutamina em aspartato e amônia e provém precursores biossintéticos como purinas e piridiminas para a síntese de DNA e RNA (Curi *et al*1999). A glutamina também se destaca na síntese da glutationa, um importante antioxidante celular, além de possuir um papel central no transporte de nitrogênio pelo corpo, que é o substrato para a aminogênse renal (Oba et al. 2004).

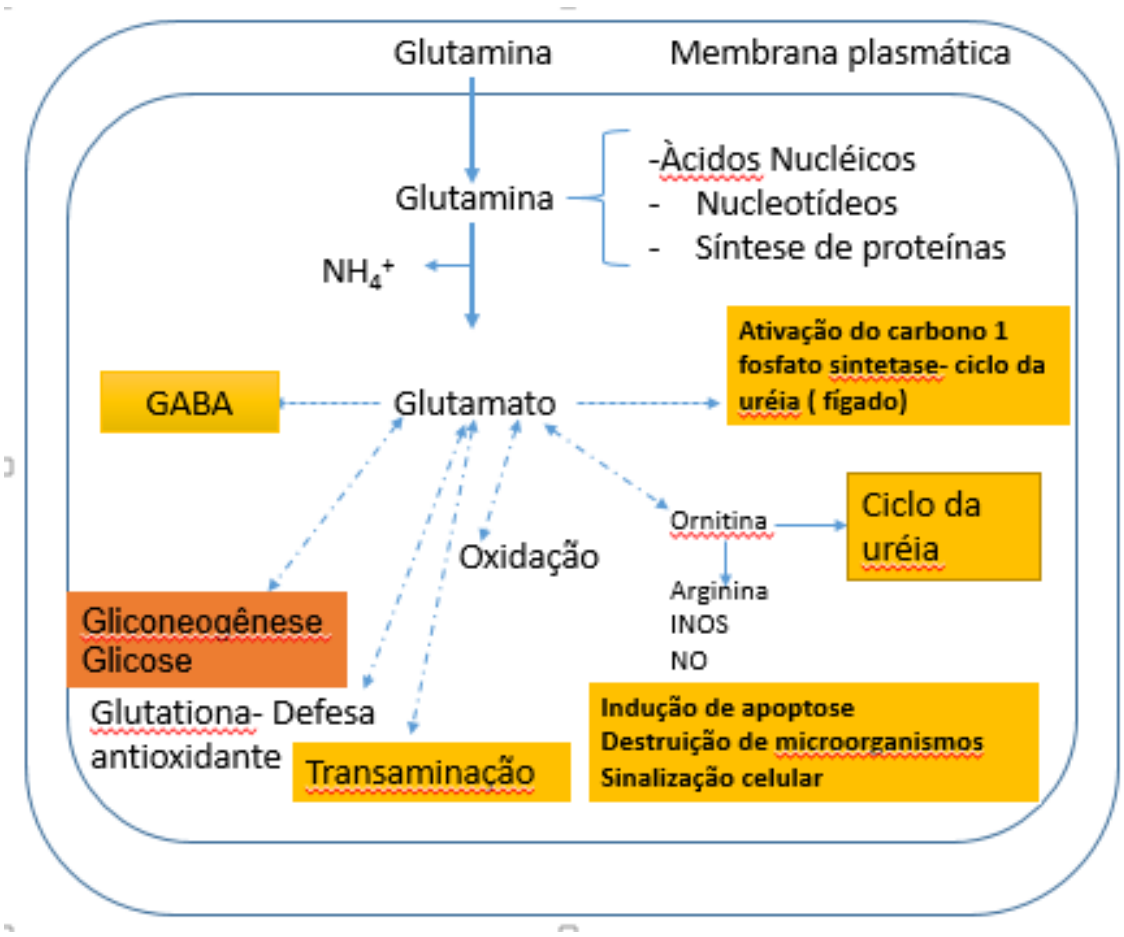


Figura 03. Síntese da glutamina

Fonte: Adaptado de News holme *et al*2003.

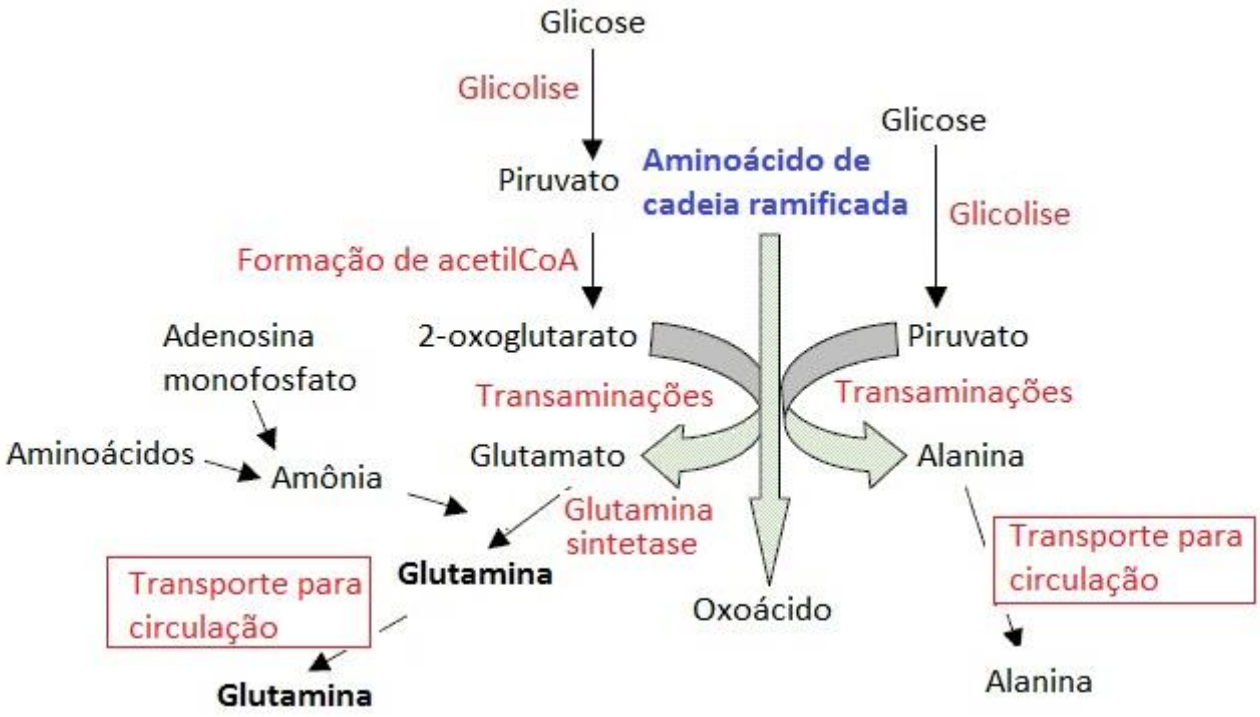


Figura 04. Metabolismo da glutamina

Fonte: Medicina na prática. http://www.medicinapratica.com.br/tag/l-glutamina/. Acesso em 26.10.15

2.8.4 METABOLISMO E CATABOLISMO DA GLUTAMINA DURANTE A DOENÇA / METABÓLICA, INFECCIOSA

A regulação da glutamina ocorre por dois mecanismos: a) aumento da transcrição em função da ação hormonal e b) regulação da estabilidade das proteínas em resposta à concentração de glutamina (Abcouwer et al. 1995 e Labow et al. 1998). Em situações de stress fisiológico há um aumento na concentração plasmática de citocinas e hormônios como os glicocorticóides. Glicocorticóides são hormônios que reconhecem efeitos do metabolismo das proteínas, carboidratos, lipídeos que são chaves no processo da resposta inflamatória aguda (Mezzarobba et al. 2003).

A despeito da ação da glutamina podemos destacar a sua importância na diabetes tipo II. A glutamina aumenta a expressão de GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon) um hormônio secretado a partir das células intestinais em resposta à nutrientes e é rapidamente degradada pelo dipeptidil peptidase (DPP-4). Esse hormônio atua sobre a secreção de insulina, proliferação de células beta, retardamento e esvaziamento gástrico que são fenômenos importantes para o paciente da diabetes tipo II. (DJ 2006; JJ 2009 e MA 2004).

Samoch a-Bonet *et al* (2014) estudando o efeito glicêmico após 4 semanas de uso oral da glutamina em pacientes diabetes tipos II tratados com metiformina observou uma diminuição da glicemia nesses pacientes associadas com uma expansão do volume plasmático leve.

A glutamina é essencial para a síntese de glutationa (GSH), que é o principal antioxidante celular. A depleção de glutamina, principalmente no meio intracelular contribui para que haja um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as agentes antioxidantes o que favorece a oxidação de substâncias essenciais para a manutenção da integridade celular. (Roth *et al*2002; Valencia *et al*2002; Gardner 1975).

Nesse sentido Fläring *et al*. (2003) trabalhando coma suplementação durante três dias com glutamina em indivíduos submetidos a eventos de estresse metabólico – cirurgias na região abdominal mostrou que a glutamina atenuou a depleção de GSH, fato que beneficiou a recuperação dos pacientes. Assim, a suplementação com glutamina pode representar uma intervenção nutricional eficaz na recuperação de indivíduos com traumas e submetidos a situações extremamente catabólicas, como as decorrentes do exercício físico, uma vez que atenua a degradação dos estoques de antioxidantes corporais.

2.8.5 A importância da glutamina nas células do sistema imune

A nutrição parenteral é usada em pacientes que tem doenças críticas. A administração oral é feita com uma mistura aquosa de aminoácidos devido à instabilidade da glutamina. (Souba *et al*, 1990).

Lin e colaboradores (2002) estudando o efeito da suplementação da glutamina em pacientes em estados de doença crônica observaram que houve um aumento significativo de células TCD4+. Esses resultados também foram vistos por Li *et al* (1997) que mostrou em estudos *in vivo* com animais que a depressão de células CD4+/CD8+ foi restabelecida após a administração com a glutamina. yO'Riordain et al.(1994) avaliou o efeito da glutamina em pacientes após a ressecção colo retal . Para tanto isolou as células mononucleares do sangue periférico desses pacientes e demonstrou que após a suplementação com glutamina houve uma melhor resposta de células T e síntese de DNA quando comparado ao grupo controle. Chang *et al* (1999) estudando a proliferação de linfócito após a administração da glutamina em células mononucleares

do sangue periférico em indivíduos saudáveis demonstrou que a glutamina aprimora a capacidade de proliferação dos linfócitos , aumenta a produção de ROS intracelular e bloqueia a síntese de GSH (glutationa exógena) e eleva a produção de ROS pós o estímulo com PHA (phitohemaglutinina).

2.8.6 Benefícios da glutamina

A glutamina é um nutriente importante em estado de doenças graves ou de lesão. Em estados catabólicos como sepse e choque a glutamina é liberada do tecido muscular o que sinaliza um sinal stress fazendo com que aja ativação de genes para promover a proteção celular bem como a regulação imune (PE 2006). A glutamina também é a principal fonte dos enterócitos. Essa hipótese foi vista por KLESS *et al* (2002) que trabalhando com ratos em estado de hipóxia demonstrou que em hipóxia, o transporte de glucose e glutamina são diferencialmente regulados independentemente de luminal nutriente presente, o comprometimento da glicose, mas não da atividade da glutamina justifica o transporte para determinar a regulação diferencial de transportadores durante a hipóxia.

O intestino delgado é o local principal de absorção da glutamina. Essa absorção acontece na borda em escova via epitélio dependente de sódio, e em menor extensão via canal independe de sódio num sistema de transporte de aminoácido (CHOUDRYHÁ et al, 2006).

A glutamina também exerce um papel fundamental na síntese de nucleotídeos, anticatabólico, possui propriedades antioxidantes via metabolismo da glutationa e pode

induzir a responsividade do sistema imune. Ainda acrescenta em seus benefícios a produção da arginina que é um aminoácido participativo na reconstituição celular e na modulação da resposta imune. (HOUDIJK AP *et al*1998, CKLESS K *et al*2007).

A glutamina pode induzir HSP25 e HSP72 que são duas proteínas do choque térmico em vários órgãos o que pode diminuir a mortalidade do hospedeiro e reduzir o dano tecidual local. Em adição a essa produção de proteínas do choque térmico, a glutamina também confere proteção por atenuação das citocinas pró-inflamatórias por interferir no sinal de transdução do NFkBe p38/ERK. A glutamina intravenosa também induz imunidade na mucosa por promover a proliferação de linfócitos associados ao intestino delgado e a secreção de IgA. (SINGLETON KD et al, 2005, LAI YN *et al*2004).

3.0 HIPÓTESE E OBJETIVOS

H0- O atual diagnóstico IGRA-QTF-TB é útil para o prognóstico dea TB doença

H1 - O atual diagnóstico o IGRA-QTF-TB NAO é útil para o prognóstico de TB doença.

H2- 0 - A glutamina NÃO interfere em marcadores da resposta imune na tuberculose

H2 - A glutamina interfere em marcadores da resposta imune na tuberculose.

OBJETIVO GERAL

Descrever a resposta imune e o efeito da glutamina na produção de citocinas e ativação celular de indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* no kit de Ensaio de liberação de Interferon Gama (IGRA) usado no diagnóstico *in vitro* da tuberculose pulmonar humana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a resposta de indivíduos com tuberculose infecção latente e tuberculose doença utilizando o kit de Ensaio de liberação de Interferon Gama (IGRA) comercial disponível usado como teste de diagnóstico *in vitro* da tuberculose pulmonar humana no Brasil.

2. Descrever o perfil de citocinas do perfil TH1/TH2 e IP-10 pós estímulo inespecífico e específicos com antígenos de Mycobacterium do kit de Ensaio de liberação de

Interferon Gama (IGRA) comercial disponível usado como teste de diagnóstico *in vitro* da tuberculose pulmonar humana no Brasil.

3. Descrever o efeito da glutamina sobre a expressão de moléculas de fenótipo e função celular em linfócitos e monócitos e liberação de citocinas em sangue exposto a mitógeno e antígeno de Mycobacterium no kit de Ensaio de liberação de Interferon Gama (IGRA) comercial disponível usado como teste de diagnóstico *in vitro* da tuberculose pulmonar humana no Brasil.

4. Avaliar o perfil leucocitário nos indivíduos com tuberculose latente e tuberculose doença.

4.1 RESULTADOS

The IGRA may be a predictor of pulmonary tuberculosis?

Authors: Rosalina Guedes Donato Santos[1]; Marilda Casela[2]; Valdirene Leão Carneiro[3]; Eduardo Martins Netto[4]; Roberto Meyer[5]; Lucas Pedreira de Carvalho[6]; Songeli Menezes Freire[7].

1. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT; Faculdade da Ciência e Tecnologia. 2- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT; Hospital Otávio Mangabeira. 3- Professora Universidade Estadual da Bahia -4- Médico Hospital Univ. Prof. Edgard Santos/UFBA e Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose (IBIT/Fundação José Silveira). 5- Professor Titular da Universidade Federal da Bahia; Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; 6-Professor da Universidade Federal da Bahia; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT. 7- Professora da Universidade Federal da Bahia; Professora da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT.

Summary

Introduction. Tuberculosis is an important public health infectious disease and the diagnosis in contacts is not simple nor predictive of disease. This paper raises a possibility to use the IGRA (interferon gamma release assay) as a predictor of tuberculosis disease. **Methods**. 158 individuals were included in the cohort. 57 cases with no history of contact of pulmonary tuberculosis patients and with negative tuberculin skin test (TST) (**Health**), 70 contacts with positive (>4mm) TST (**LTBI**), 17 patients with active tuberculosis before treatment (**TBnRx**) and 14 during the treatment (**TBRx**). (IGRA) were used following company instructions. 95% confidence intervals were used to calculate theoretical disease frequency among positive IGRA individuals who developed tuberculosis. Both contact groups were followed through public health surveillance system for 24 months. **Results**. 10/57 (17.5%) individuals in the health group were IGRA positive of those 4 (40% - CI95% - 16.8-68.7%) developed tuberculosis during the follow-up time. None out of 70 individuals developed tuberculosis even if 65 (92.9%) were positive for IGRA. IGRA were positive in 76.5 (13/17) in TBnRx group and 85.7% (12/14) in the TBRx group. **Conclusion**. IGRA showed a quite significant amount of individuals developed tuberculosis within contacts with TST negative and IGRA positive.

Key Words: IGRA, LTBI, Healthy , predictor.

Introduction

Although data from world health organization shows that there is a trend to decrease the number of cases and significant fall in the mortality, some 45% tuberculosis is still a public health problem because one third of the humankind is infected with the *M. tuberculosis* (WHO 2014). The STOP TB partnership is targeting to reduce tuberculosis disease by 50% by 2025. This cannot be reached without new strategy to find and treat the individuals who would be prone to develop disease. In Brazil, tuberculin a positive skin test (TST) may be even less predictive due to BCG vaccination (constock tissot) confounding the golden rule of 5 plus 5% (Morán-Mendoza et al 2007) . Moreover, Teixeira and cols (2007) showed that the TST sensitivity is around 80% and specificity is only 70%. Thus, is this paper we show an interesting result tuberculosis disease development within contact with negative TST and positive IGRA.

Methods

Study sample selection

Patients with tuberculosis diagnosed either by a positive AFB (Acid Fast Bacilli - two samples) in the sputum or positive culture from two reference centers for tuberculosis treatment: Hospital Especializado Otávio Mangabeira (HEOM) or Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose – Fundação José Silveira (IBIT/FJS) and their contact were asked to participate in the study. All patients signed and informed

consent approved by Bahian School of Medicine and Public Health Research Ethic committee 119/2011.

Inclusion criteria: individuals with both genders, vaccinated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG), aged from 18 to 65 years were divided into four groups: (1) **Health group** (n = 57) as defined as asymptomatic individuals with no history of significant contact of patients with pulmonary tuberculosis, with negative (less than 4mm) tuberculin skin test (TST) read by a well trained individual. Contact was defined as four or more hours per day for at least two week of exposure to an individual with AFB positive pulmonary tuberculosis (lancet). (2) **TBIL group** (n = 70) as defined as individuals exposed as contacts with TST greater or equal to 5 mm, but without any signs or symptoms of disease. (3) **TBnRx group** (n= 17) individuals with AFB positive (2 samples or Lowenstein-Jansen culture) and suggestive for tuberculosis thorax X-rays (confirmed TB) without treatment of tuberculosis. And (4) **TBRx group** (n= 14) individuals with confirmed TB under treatment.

Each participant provided 3 mL whole blood that were divided into the three QuantiFERON®-TB Gold (IGRA) (Cellestis®) tubes and processed following company instructions (REF). IL-10 was quantified thru array beads cytokine (eBioscience®) and the results analysed by the company software.

Description of the study population was performed using SPSS 18.0 (IBM statistics). Confidence intervals of 95% were calculated following Score with Continuity Correction Fleiss Quadratic (Dean, 2015). Medians of IL-10 expressions were compared between the Health group and TBIL with Mann-Whitney-U statistic.

RESULTS

The demographic characteristics among the four-studied groups are stated in the table. Individuals with tuberculosis were older than contacts. Male proportion was evenly distributed among the groups. Health group individuals had more tuberculosis – 4/10 (40% - CI95% - 16.8-68.7%) than those individuals in the LTBI group who were within the expected incidence (0% - 95%CI: 0.0- 7.0) in the follow-up of 24 months. IGRA was positive in 76.5 (13/17) in TBnRx group and 85.7% (12/14) in the TBRx group (table). The median of IL-10 cytokine expression among individuals with positive IGRA but negative TST (Health group) were greater than in those in the LTBI group ($p<0.01$).

Tabela - Demographic and diagnostic characteristics of patients with pulmonary tuberculosis and their contacts domésticos 1 two reference centers for the treatment of tuberculosis in Salvador, Bahia, 2015

Variables	Contacts of patients with tuberculosis		Patients TB	
	TST * negative (n=57)	TST positive (n=70)	No treatment (n=17)	In treatment (n=14)
Age(mean and [standard deviation])	32,5 [3,0]	39,7 [2,0]	45,8 [2,0]	48,4 [3,0]
Male gender (n - %)	30 (52,6)	52 (74,3)	10 (58,8)	12 (85,7)
Feminine gender (n - %)	27(47,4)	18 (25,7)	7(41,2)	2(14,3)
Smear positive** (n - %)	0)	0 (0,0)	17 (100)	14 (100)
Tuberculin test(TST) (n - %)				
≤ 4 mm	32 (56,1)	0 (0,0)	3 (17,6)	0 (0,0)
4 a 9 mm	0 (0,0)	23 (32,9)	3 (17,6)	9 (64,3)
≥ 10 mm	0 (0,0)	47 (67,1)	11 (64,7)	5 (35,7)
Positive IGRA*** (n - %)	10 (17,5)	65 (92,9)	13 (76,5)	12 (85,7)
Tuberculosis among IGRA positive (n - %)	4 (40,0)	0 (0,0)	-	-

* - TST:tuberculin test (PPD); ** - Positive AFB smear or culture positive; *** - IGRA: interferon gamma release assay.

1 -Contact Definition: more than 4 hours per day for at least 2 weeks of exposure to the individual with pulmonary TB .

Discussion

Diel et al (2008) compared the TST and IGRA in individuals with latent tuberculosis and noted that after two years of follow-up the IGRA a good predictor of disease compared to TST. These findings corroborate our study findings that showed a discrepancy between TST and IGRA. We found that 10 vaccinated individuals negative for TST but positive for IGRA after followed-up for two years had a high incidence of tuberculosis. Moreover, we showed that these individuals expressed much more IL-10 than those the LTBI. Data not shown in this study indicate that the individuals with positive TST and negative IGRA had a low production regulatory T cells (Treg) that can leaded to inhibition of activity of antigen presenting cells, or loss of expression of costimulatory molecules (CD40 and B7). Thus, the APCs (Antigen presenting cells) to continue presenting antigens but are not able to activate lymphocytes suggesting that down regulation is also a crucial factor in effective response. IL-10 is also implicated in blocking antigen processing and presentation in different APCs, therefore diminishing T cell responses (Moore et al., 2001). Experimental data in murine models show that IL -10 alone has the role of reactivating latent tuberculosis and thereby contribute to the reactivation of the disease. (Turner et al., 2002; Beamer et al., 2008).This may indicate that the use of IGRA can break new ground in identifying new TB cases. This monitoring can lead to the early diagnosis and a decrease of cases of latent infection which may be of help in decreasing disease throughout the world.

The diagnosis of latent infection (LTBI) is a challenge for controlling

tuberculosis. Further tests that detect IFN-γ vitro in response to the release of antigens present in the Mycobacterium tuberculosis complex have been evaluated as more sensitive and specific tests. Several studies have demonstrated the importance of cytokines as markers of tuberculosis activity and its protective immune function in the regulation of immune and inflammatory response against mycobacteria (Perez et al., 2001; ABRAMO et al., 2006). Although the tuberculin skin test is the preferred test for immunological diagnosis of tuberculosis many studies have shown that populations vaccinated with BCG (Bacille Calmette-Guérin) has a greater chance of having a positive result in TST. (Comstock et al 1966; Tissot et al 2005). The low specificity TST mainly in vaccinated populations has called into question the use of this standard as a test in the diagnosis of latent tuberculosis. Furthermore, TST can have false negative results in conditions where there is a suppression of T cell response (as in HIV positive patients) (Grabau et al 1995). In addition to immunological factors other factors may interfere with the interpretation of the results of the TST. These factors have to do with application rate, the technical skill and the interpretation of results. Low rates of application of the TST (e.g. 2 IU) may generate a false negative result while higher application rates (e.g. 10 IU) can provide a false positive result. (Stuart et al 2000).

The IGRA is an immunoassay using antigen of BCG difference region which improves the specificity of the diagnosis of tuberculosis especially in vaccinated populations. When compared to the TST the IGRA offers advantages such as the need for only one visit to the lab, automation in testing which reduces the chance of errors in interpreting the results, not

because the booster effect, especially in health care workers, the result happens in just 24 hours and samples may be stored for a long period of time. (Mazurek et al 2005, Trajman A. et al 2013).

Conclusion

The IGRA showed sensitivity for the diagnosis of tuberculosis in individuals' household contacts not evidenced by PPD that could be in a very early stage or immune cancellation due to factors such as dow regulation.

Bibliographic reference

ABRAMO C; MEIJGAARDEN E. K.; GARCIA D. ; FRANKEN C.M.L.K; KLEIN.M.;KOLK J.A.;OLIVEIRA.;OTTENHOFF M.H.T.; TEIXEIRA C.H. Monokine induced by interferon-gamma and IFN-Y response to a fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. **Revist Microbes and Infection**, v.8, p.45-51,2006.

A. Trajman et al. Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. **Pulmonary Medicine.** Vol 13 pages 1-13, 2013.

Beamer G. L., Flaherty D. K., Assogba B. D., Stromberg P., Gonzalez-Juarrero M., de Waal M. R., Vesosky B., Turner J.. Interleukin-10

promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. J. Immunol. 181, 5545–5550,2008.

Comstock, G. W., and Palmer, C. E. Long-Term Results of B. C. G. Vaccination in the Southern United States. **Amer. Revist Respiratory Diseases**, *93:* 171-183, 1966.

Comstock GW. False tuberculin test results. Chest.68:465–9, 1975.

Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. www.OpenEpi.com, updated 2015/05/04, accessed 2015/08/11.)

Grabau C.J; DiFerdinando T.G.; Novick F.L. False Positive Tuberculosis Skin Test Results. **Public Health Reports..**110 : 703-706, 1995.

Morán-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick DM, FitzGerald JM. Tuberculin skin test size and risk of tuberculosis development: a large population-based study in contacts. **International Journal Tuberculosis Lung Disease.**2007;11:1014-20

Moore K. W., de Waal M. R., Coffman R. L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor**.** Annual. Review. Immunology. 19, 683–76510.1146/annurev.immunol.19.1.683 , 2001.

Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection. United States. MMWR Recomm Rep.;54:49–552005.

Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B. & Martin, C. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. **Molecular Microbiology** 41, 179–187, 2001.

PROGRAM NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE, Ministério da Saúde*:* ***Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose noBrasil,***2010.

Stuart RL, Bennett N, Forbes A, Grayson ML. A paired comparison of tuberculin skin test results in health care workers using 5 TU and 10 TU tuberculin. Thorax.;55:693–5, 2000.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Journal Bras Pneumology.**33(3):323-334, 2007.

Tissot F, Zanetti G, Zellweger JP, Zysset F. Influence of bacilleCalmette-Gue´rinVaccinationon size of tuberculin skin test reaction: to what size. **Clinical Infectious Disease**; 40:211–7, 2005.

Turner J., Gonzalez-Juarrero M., Ellis D. L., Basaraba R. J., Kipnis A., Orme I. M., Cooper A. M. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. Journal. Immunology. 169, 6343–6351 , 2002.

WHO. WORLD Health Organization. Global tuberculosis control:surveillance, planning,financing: **WHO report 2009**. WHO/HTM/TB/2008.393.Geneva, Switzerland: WHO, 2009.

WHO. WORLD Health Organization. Global tuberculosis control:surveillance, planning,financing: **WHO report 2014**. WHO/HTM/TB/2008.393.Geneva, Switzerland: WHO, 20014.

ARTIGO 02

Avaliação da produção de IL-2, IL-6, IL-8, TNF , LINFOTOXINA, IL-10, IFN-GAMA, IL12p70 E TGF-BETA em sangue periférico estimulado *in vitro* no teste diagnóstico da tuberculose de indivíduos adultos vacinados com BCG

Autores: [1]Rosalina Guedes Donato Santos; [2]Marilda Casela, Valdirene Leão Carneiro[3], Jorge Clarêncio [4], [5] Eduardo Martins Netto, [6]Roberto Meyer , [7]Lucas Pedreira de Carvalho, Geraldo Sampaio Pedral[8] [9]Songeli Menezes Freire.

1. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT ; Faculdade da Ciência e Tecnologia. 2- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT; Hospital Otávio Mangabeira. 3- Professora Universidade Estadual da Bahia -4-Laboratório integrado de microbiologia e imunoregulação-LIMI-CPqGM-Fiocruz-Ba e Professor da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.5-Professor da Faculdade de Medicina UFBA; Médico Hospital das clínicas e Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose. 6- Professor Titular da Universidade Federal da Bahia; Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular-7-Professor da Universidade Federal da Bahia; ; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT. 8- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular 9-

Professora da Universidade Federal da Bahia; Professora da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública ; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT.

Resumo

As citocinas são mediadores solúveis chaves no disparo e na manutenção da resposta imune do hospedeiro contra agentes diversos, como ocorre na tuberculose. Proteínas secretadas pelo *Mycobacterium tuberculsosis,* como ESAT-6, TB7.7(p4) e CFP-10, antígenos altamente virulentos e patogênicos, encontram-se presentes na suspensão de kit de diagnóstico *in vitro* comercialmente disponível na atualidade.O objetivo desse estudo foi avaliar múltiplas citocinas pós-estímulo realizado no diagnostico *in vitro em um grupo de indivíduos com e sem infecção.* Fizeram parte do estudo 191 participantes, sendo 70 individuos incluídos no grupo controle (PPD negativo, sem sintomatologia ou historia clinica) com 38 pacientes do sexo feminino e 32 do sexo masculino. No grupo de infecção latente de tuberculose (LTBI, TST positivo, sem sintomatologia ou queixa clinica) foram 70 indivíduos sendo 39 do sexo feminino e 31 do sexo masculino e o grupo com tuberculose ativa (TBnRX- tuberculose doença) participaram 51 indivíduos sendo 30 do sexo feminino e 21 do sexo masculino. Nesse trabalho, a população foi composta de adultos que apresentavam cicatriz vacinal de BCG e todos fizeram TST e IGRA. As dosagens de citocinas **IL-2, IL-6, IL-8, TNF, LINFOTOXINA, IL-10, IFN-GAMA, IL12p70 E TGF-BETA**. Nos cálculos em Curva ROC foram utilizados os parâmetros de positividade em Cultura ou baciloscopia para a tuberculose e o PPD positivo para o LTBI. A média de idade foi 34.82, 37.73 e 36. 7 nos grupos controle, LTBI e tuberculose ativa, respectivamente. Com o IGRA foi possível distinguir os

grupos LTBI de TB. Entre as citocinas estudadas no CBA observou-se que o IFN-gama também foi a citocina de maior poder de distinção entre os grupos LTBI e TB. Com a curva ROC determinou-se a sensibilidade de 0.75 para IFN-gama do IGRA e do CBA e 0.55 para as outras citocinas analisadas com CBA no grupo TB. Com estes antígenos, no modelo estudado, a produção de IFN-gama confirma ser um bom biomarcador para distinguir a TB ativa e a latente na população vacinada com BCG.

Palavras chaves: Citocinas,tuberculose,IGRA

ABSTRACT

Cytokines are soluble mediators keys in shooting and maintenance of the host immune response against several agents, as in tuberculosis. Proteins secreted by Mycobacterium tuberculsosis as ESAT-6, TB7.7 (p4) and CFP-10, highly virulent and pathogenic antigens, are present in commercially vitro diagnostic kit suspension available in atualidade.O objective was evaluate multiple post-stimulating cytokines performed in vitro diagnosis in a group of individuals with and without infection. Participants were 191 participants, 70 individuals included in the control group (negative PPD without symptoms or medical history) with 38 female patients and 32 male. In latent infection group of tuberculosis (LTBI, positive TST without clinical symptoms or complaints) were 70 individuals with 39 female and 31 were male and the group with active tuberculosis (TB disease TBnRX-) participated 51 individuals and 30's female and 21 male. In this study, the population consisted of adults who had BCG vaccination scar and all made TST and IGRA. The dosages of IL-2 cytokines IL-6, IL-8, TNF, Lymphotoxin, IL-10, IFN-gamma, IL12p70 and

TGF-beta. In the calculations in the ROC curve positivity parameters were used in culture or sputum smear microscopy for tuberculosis and positive PPD for LTBI. The mean age was 34.82, 37.73 and 36. 7 in the control group, LTBI and active tuberculosis, respectively. With the IGRA was possible to distinguish between LTBI TB groups. Among the cytokines studied in CBA we observed that IFN-gamma cytokine was also greater power of distinction between groups LTBI and TB. With the ROC curve was determined sensitivity of 0.75 for IFN-gamma and IGRA CBA and 0:55 for the other cytokines analyzed by CBA in the TB group. With these antigens in this model, IFN-gamma confirmed to be a good biomarker for distinguishing between active and latent TB in BCG vaccinated population.

Key words : Cytokines , tuberculosis, IGRA

Introdução

As citocinas são mediadores solúveis chaves no disparo e na manutenção da resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculsosis*. Além da produção de citocinas ,principalmente o IFN-gama, a formação do granuloma é um ponto central para a contenção do *Mycobacterium tuberculosis* (Etna P.M; Giacomini E., Severa M. Coccia M., 2014).

Proteínas secretadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* como ESAT-6 e CFP-10 são antígenos altamente virulentos e patogênicos. ESAT-6 pode se ligar à laminina e causar a lise de células epiteliais do pulmão, por isso sugere-se que este antígeno tenha um papel central na disseminação da bactéria o que pode levar a um quadro de reativação da tuberculose. (Kinhikar A. G., Verma I., Chandra D.et al, 2010). ESAT-6 também é responsável por induzir a produção de citocinas como IL-1β secretadas por macrófagos e inibe a produção de IFn gama indicando um papel chave entre o link da imunidade inata e adaptativa. (Mishra B. B., Moura-Alves P., Sonawane et al 2010; Peng H., Wang X., Barnes P. F.,et al 2011). Além disso, ESAT-6 também aumenta a produção de IL-8 por aumentar a expressão de RNAm. (Boggaram V1, Gottipati KR, Wang X, Samten B , 2013.)

IFN-γ produzido a partir de células T tem sido usada como diagnóstico, porém, somente a produção dessa citocina não é capaz de garantir o sucesso da resposta imune a tuberculose pulmonar humana. Outras citocinas como fator de necrose tumoral, IL-12, IL-6 e IL-10 são importantes no controle da infecção da tuberculose. (Goldsack L, Kirman JR, 2007; Lalvani A, Millington KA. T, 2008; Keane J, Gershon S, Wise RP, et al 2001; Verreck FA, de Boer T, Hoeve M, et al.2002; Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al.2007).

Assim, diante do exposto o objetivo desse artigo foi avaliar múltiplas citocinas no sobrenadante pós estímulo com coquetel de antígenos específicos do IGRA ESAT-6,CFP-10 e TB7.7

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA 2009 com adendo/emenda aprovado em 119/2011.

Seleção da População de estudo

Os indivíduos participantes do estudo foram selecionados e diagnosticados no Hospital Especializado Otávio Mangabeira (HEOM) e no Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose (IBIT), segundo os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Todos os voluntários da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Sendo divididos em três grupos:

Grupo 1 Controle / sem infecção (n=70): Participaram desse grupo indivíduos com TST não reator (TST/PPD negativo - $\leq$5mm), sem história de contato com pacientes bacilíferos, sem historia clínica de tuberculose, vacinados (BCG).

Grupo 2 LTBI (n=70): Foram selecionados indivíduos com história de contato com pessoas bacilíferas, TST >5 mm (TST/PPD), vacinados (BCG), sem sintomas clínicos da doença e não estavam em tratamento para tuberculose.

Grupo 3 TB (n= 51): Formado por indivíduos vacinados (BCG), recém diagnosticados com tuberculose pulmonar por baciloscopia positiva e/ ou cultura positiva para Mtb, todos sem tratamento.

COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Para cada indivíduo participante do estudo foi coleta 3 mL de sangue por punção venosa, sendo 1 mL para cada um dos 3 tubos fornecidos pelo Kit QFT-IT. Após foram processados segundo as normas do fabricante e o sobrenadante foi estocado a -70º para as dosagens de citocinas posteriores. Após a coleta todos os participantes da pesquisa realizaram HIV e permaneceram na pesquisa apenas os indivíduos HIV negativos.

DOSAGEM DE IFN-γ PELO KIT QUANTIFERON (QTF)

A quantificação de IFN-γ foi feita utilizando o kit comercial QTF (Cellestis/Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. As interpretações dos dados foram feitas no software de análise da empresa.

DOSAGEM DAS CITOCINAS IL-2, IL-6, IL-8, TNF , LINFOTOXINA, IL-10, E IFN-GAMA, IL12p70 E TGF-BETA POR ARRAY BEAD CYTOKINE (CBA)

Todas as dosagens foram feitas seguindo a recomendação do kit e-bioscense sendo as amostras diluídas 1:2 e a posteriores a correção da diluição foi feita para os ajustes da concentração final das citocinas. As análises foram feitas no software disponibilizado pela empresa do kit.

ANÁLISE ESTATISTICA

As características da população de estudo foram feitas utilizando análises descritivas. As diferenças na análise estatística foram realizadas utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 5.0 e SPSS versão 19. As diferenças na produção de INF-γ em resposta aos antígenos presentes no plasma do IGRA nos grupos do estudo foram avaliadas por testes não paramétricos de kruskal-Wallis para estabelecer a significância geral entre todos os grupos. A Curva ROC /AUROC foi utilizada para calcular a sensibilidade das citocinas avaliadas considerando os parâmetros de positividade em baciloscopia para a tuberculose e o PPD positivo para o LTBI.

RESULTADOS

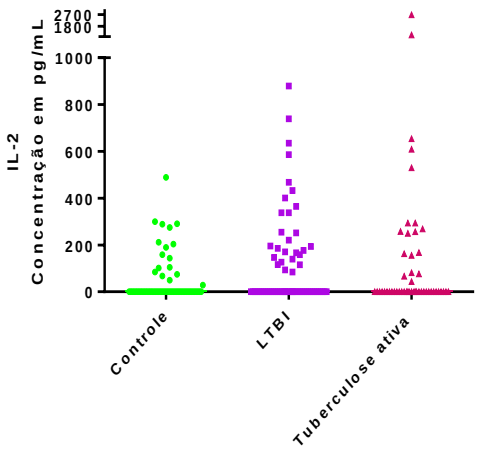
Foram estudados 185 indivíduos sendo 70 indivíduos do grupo controle com cerca de 38 (54,28%) participantes do sexo feminino e 32 (45,72%) do sexo masculino. No grupo LTBI foram participantes 70 indivíduos sendo 39 (55,71%) do sexo feminino e 31(44,29 %) do sexo masculino e o grupo com tuberculose ativa participaram 51 indivíduos sendo 30 (42,85%) do sexo

feminino e 21(57,15%) do sexo masculino. A média de idade foi 34.82, 37.73 e 36. 7 nos grupos controle, LTBI e tuberculose ativa, respectivamente. Os dados estão sumarizados na tabela 01.

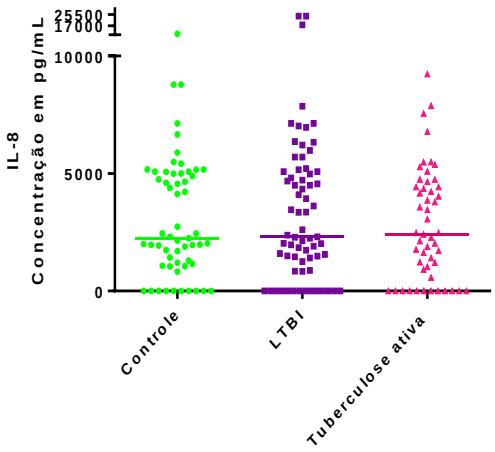
Foram excluídos desse estudo 10 (14,29%) indivíduos que foram TST negativos e QFT positivos do grupo controle e 5 (7,14%) indivíduos do grupo LTBI por serem negativos no QFT. Dados mostrados na tabela 01.

No grupo tuberculose ativa 4 (7,84%) indivíduos foram QFT negativos, mas não foram excluídos da análise porque tiveram cultura e baciloscopia positivos. Dados mostrados na tabela 01.

Os valores mínimos e máximos para IL-2 foram 0.0 – 1354, 0.0 – 3412 para os grupos controle, LTBI e tuberculose ativa, respectivamente. Sendo a média de produção para IL-2 de 49.41, 119.1 e 156.6 nos grupos controle, LTBI e tuberculose ativa. Os níveis de IL-2 não foram significativamente mais altos nos grupos testados. A média de produção de IL-8 foi de 2800, 3772 e 3097 nos grupos controle, LTBI e tuberculose ativa, respectivamente. E os valores mínimos e máximos foram de 0.0 - 10882, 0.0 - 24342 e 0.0 - 9231. Dados mostrados na Figura 01 e na tabela 02.



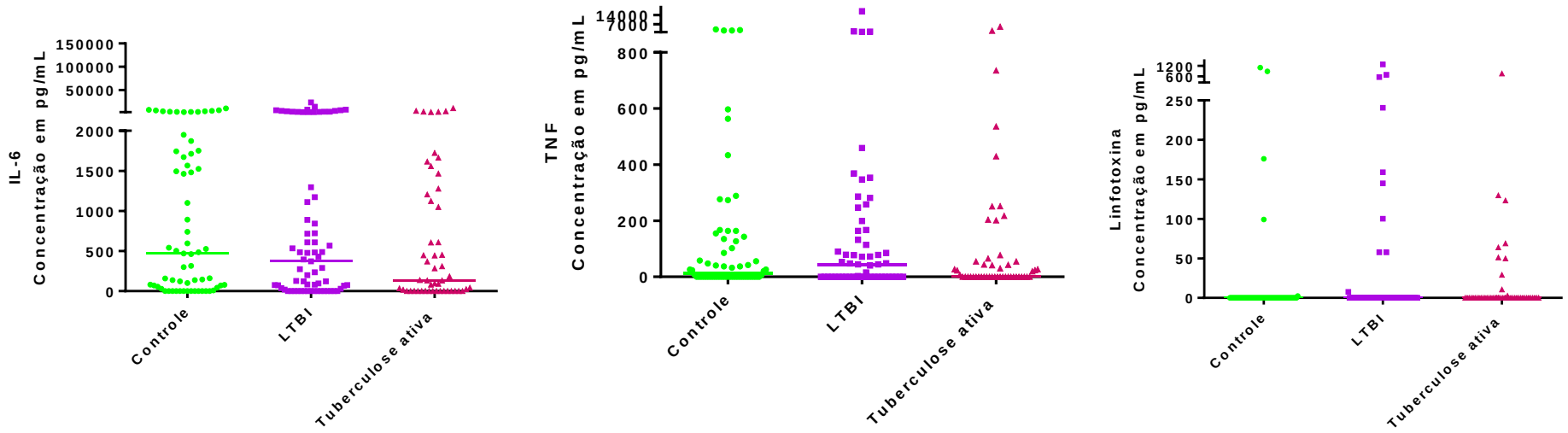
a)



b)

Figura 01.Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* IGRA (QFT-TB) em a) IL-2 e em b) IL-8 nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por CBA Facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

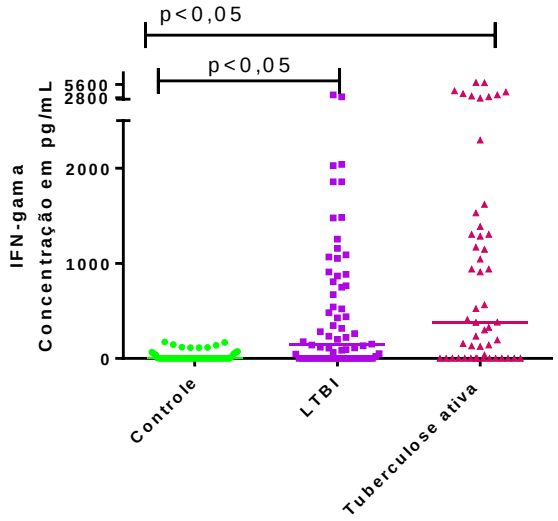
Os níveis de IL-6, TNF e linfotoxina não foram significativamente mais altos nos grupos com LTBI e tuberculose ativa. Dados mostrados na Figura 02 e na tabela 02.

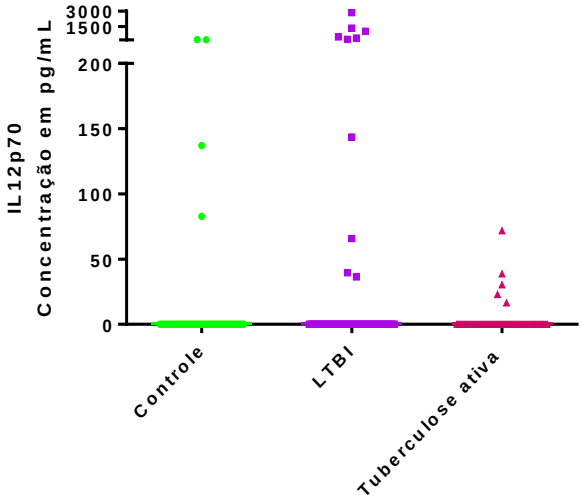


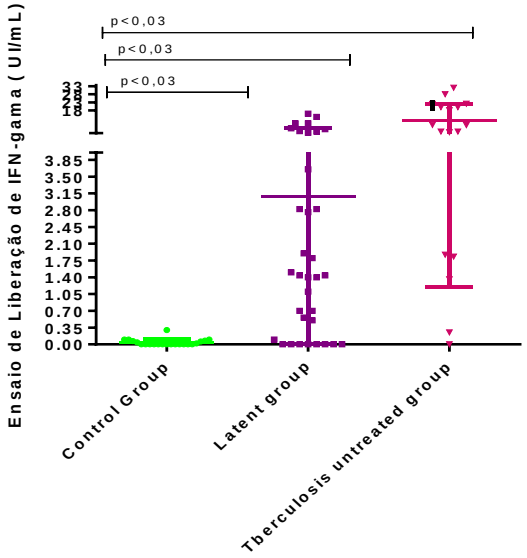
a) b) c)

Figura 02.Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* IGRA (QFT-TB) em a) IL-6 e em b) TNF e em c) Linfotoxina nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por CBA facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

Os níveis de IFN-γ foram mais significativamente mais altos nos grupos com tuberculose ativa e tendem a ser mais altos também no grupo com LTBI (p<0,05) e uma sensibilidade para o coquetel de antígenos testados de 70%. E para IL12p70 a média de produção foi de 230.4, 98.08 e 3.534 e os valores mínimos e máximos foram de 0.0 – 12646, 0.0 – 2830 e 0.0- 71.80 para os grupos controle, LTBI e tuberculose ativa. Os níveis de IFN-γ e IL12p70 não foram significativamente mais altos nos grupos com LTBI e tuberculose ativa. Dados mostrados na Figura 03 e na tabela 02.





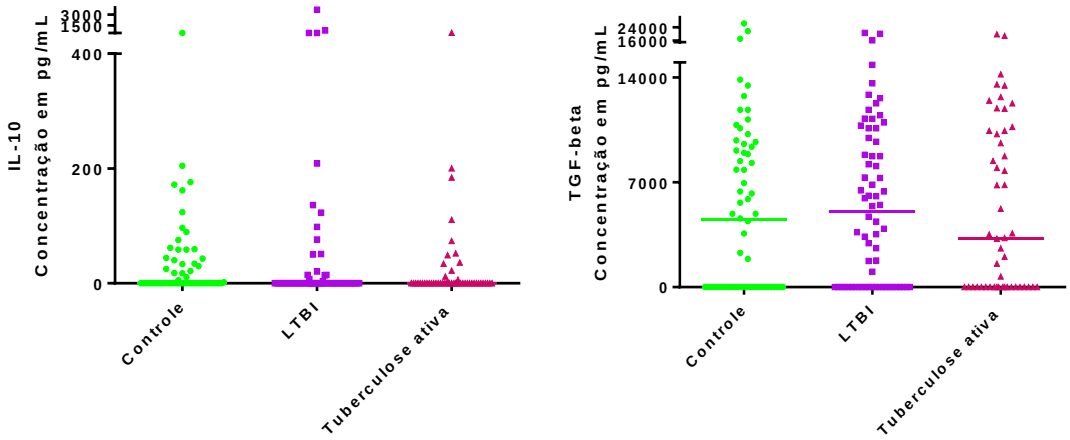


c)

b)

Figura 03.Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* **IGRA (QFT-TB)** em a) IFN-γ e em b) IL12p70 e em c) IFN-Y do kit comercial IGRA nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por **CBA** facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

Os níveis de IL-10 e TGF-β não foram significativamente mais altos nos grupos com LTBI e tuberculose ativa. Dados mostrados na Figura 04 e na tabela 02.



a) b)

Figura 04.Citocinas pós estímulo *in vitro* em cultura de sangue total com o coquetel de antígenos do *Mycbacterium tuberculosis de* IGRA (QFT-TB) em a) IL-10 e b) TGF-β nos grupos controle (N= 60), LTBI (N=65) e tuberculose ativa (N=51). Cada ponto representa um participante. Citocinas dosadas por CBA facs callibur e programa flow cytomix. O valor da mediana está expresso na linha horizontal. Foi usado o teste Kruskall Wallis para a comparação dos grupos.

CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Tabela 01. Características demográficas e laboratoriais dos 191 indivíduos estudados

Categoria dos pacientes	Sexo feminino (%)	Sexo masculino (%)	Média de idade	Cultura ou TRM		Baciloscopia		TST		QFT		Baciloscopia		
				Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	1+	2+	3+
Controle N=70	38 (54,28%)	32 (45,72%)	34,82	0	70 (100%)	0	70 (100%	0	70 (100%)	10 (14,29%)	60 (85,71)	#		
LTBI N=70	39 (55,71%)	31(44,29 %)	37,73	0	70 (100%)	0	70 (100%)	70 (100%)	0	65 (92,86%)	5 (7,14%)	#		
TBnRx N= 51	30 (42,85%)	21(57,15%)	36,17	51 (100%)	0	51 (100%)	0	*		47 (92,16%)	4 (7,84%)	8 (15,67)	33 (64,71%)	10 (19,62%)

 # Não se realiza baciloscopia para indivíduos sem sintomatologia respiratória.

* **Não realizado .**

Tabela 02. Resultados das análises das citocinas plasmáticas realizadas por CBA em resposta ao estímulo do coquetel de antígenos do teste diagnostico in vitro de indivíduos com tuberculose ativa, latente e sem tuberculose pulmonar humana.

Citocinas Sensibildiade (pg/mL)	**Tuberculose ativa N=51** Mediana (Mínimo-Máximo)	LTBI N= 65 Mediana(Mínimo-Máximo)	Controle N= 60 Mediana(Mínimo-Máximo)	Curva ROC Controle X LTBI AUROC	Valor de p	Curva ROC Controle X TB AUROC	Valor de p
IFN-gama (3.7)	381.5 (0.0 – 6003)	146,6 (0.0 – 3412)	0.0 (0.0 – 1354)	0,6966	0,0001	0,7543	< 0.0001
IL-2 (2.6)	0.0 (0.0 – 2686)	0.0 (0.0 – 22617)	0.0 (0.0 – 489.2)	0,5899	0,07735	0,5542	0,3225
IL-6 (3.2)	134.3 (0.0 – 117190)	383,2 (0.0 – 22932)	470.6 (0.0 – 10325)	0,5154	0,7611	0,5778	0,1543
IL12p70 (2.9)	0 (0.0 - 71.80)	0,0 (0.0 – 2830)	0 (0.0 – 12646)	0,5254	0,6156	0,5033	0,9523
IL-8 (3.0)	2411 (0.0 - 9231)	2342 (0.0 - 24342)	2245 (0.0 - 10882)	0,5089	0,8642	0,5361	0,5182
TNF (3.8)	0.0 (0.0 - 60131)	44.13 (0.0 - 16953)	14.19 (0.0 - 2885)	0,5374	0,4836	0,5239	0,6631
Linfotoxina (4.0)	0.0 (0.0 - 764.1)	0.0 (0.0 - 1280)	0.0 (0.0 - 1103)	0,5327	0,5201	0,5542	0,3225
IL-10 (4.5)	0.0 (0.0 - 438.2)	0.0 (0.0 - 3691)	0.0 (0.0 - 422.6)	0,5748	0,1399	0,5792	0,1470
TGF-beta (3.0)	3274 (0.0 - 31416)	5060 (0.0 - 30625)	4593 (0.0 - 69133)	0,5271	0,5931	0,5176	0,7475

DISCUSSÃO

A produção de citocinas e quimiocinas no plasma não estimulado ou após o estímulo com antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* tem sido usado como uma forma de teste mais sensível a fim de monitorar antes do diagnóstico da tuberculose e após o início do tratamento. (Mihret M; Abebe M., 2013).

Tebruegge . et al. (2015) trabalhando com crianças e dosando as citocinas IFN-γ, IP-10, TNF-α, IL-1ra, IL-2, IL-13, and MIP-1β no plasma do IGRA demonstrou que há uma produção mais elevada de IFN-γ nos grupos LTBI e TB. Além disso, também demonstrou que a razão entre TNF-α/IL-1ra e TNF-α/IL-10 podem ser biomarcadores de distinção entre LTBI e TB.

No presente trabalho com adultos vacinados se demonstrou que IFN-gama foi a citocina com um maior poder de distinção entre os grupos LTBI e TB.

Entretanto, em outros trabalhos do grupo com IP-10 (dados não dados não publicados) os pacientes com tuberculose ativa tiveram uma alta produção dessa citocinas pós estímulo com os antígenos específicos o que pode ser utilizado como uma ferramenta diagnóstica para a nossa população vacinada.

Os pacientes que tiveram BAAR entre 2+ e 3+ tiveram uma produção de IFN-gama, TNF e IL-6 mais elevados do que aqueles que com 1+, o que sugere que quanto maior o dano causado pelo agente mais citocinas

inflamatórias são requeridas para o local da infecção. Entretanto, deve-se levar em consideração que a indicação de cruzes nos exames com menor número de patógeno pode ser decorrente da capacidade reduzida de expectoração de bacilos pelo paciente, o que compromete a qualidade da amostra na fase pré-analítica.

Além disso, em nosso trabalho também foi visto uma baixa produção de IL12p70, uma citocinas produzida pelas células dendríticas. Segundo Søndergaard JN et al 2014 o *Mycobacterium tuberculosis* promove uma dowregulation dessa citocina para que haja uma produção maior de IFN-gama demonstrando assim a plasticidade do nosso sistema imune corroborando com os nossos dados que mostram uma baixa produção de IL12 em detrimento de altas concentrações de Interferom gama.

A ativação dos macrófagos acontece via produção de IFN-gama, esse é o primeiro mecanismo que garante o sucesso da resposta imune. Porém, a produção de IFN-gama pode ser influenciada por vários fatores como a secreção de IL-10, IL-18 e IL-12. Em nosso trabalho, foi visto que a produção de IFN-gama não foi afetada pois os índices de produção da IL-10 foram diminuídos cerca de duas a três vezes em relação ao IFN-gama. Resultados similares foram vistos por Yu et al 2011 que trabalhando com pacientes com tuberculose demonstrou uma produção elevada de IFN-gama no grupo com tuberculose e uma produção mais baixa de IL-10, IL12 e IL-18 conferindo uma resposta inflamatória benéfica para o hospedeiro na luta contra a tuberculose.

A importância dessa citocina foi vista mais uma vez na sensibilidade do teste pela curva ROC que demonstrou uma sensibilidade de 0.75 para IFN-gama no quando dosado no CBA e no IGRA foi de 0.85 e 0.55 para as outras citocinas testadas nesse estudo. Em suma, a produção de IFN-gama foi o biomarcador mais promissor para distinguir entre a TB ativa e latente na população vacinada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÀFICAS

1. Etna P.M ; Giacomini E. , Severa M. Coccia M. Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. **Seminars in Immunology.** Volume 26, Issue 6, Pages 543–551 , 2014.

2. Kinhikar A. G., Verma I., Chandra D., Singh K. K., Weldingh K., Andersen P., Hsu T., Jacobs W. R. Jr.., Laal S. Potential role for ESAT6 in dissemination of M. tuberculosis via human lung epithelial cells. **Mol. Microbiol**. Vol 75, pages 92–106, 2010.

3. Mishra B. B., Moura-Alves P., Sonawane A., Hacohen N., Griffiths G., Moita L. F.,Anes E. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cell Microbiol**. Vol.12, pages1046–1063, 2010.

4. Peng H., Wang X., Barnes P. F., Tang H., Townsend J. C., Samten B. The Mycobacterium tuberculosis early secreted antigenic target of 6 kDa inhibits T cell interferon-γ production through the p38 mitogen-activated protein

kinase pathway. **Journal Biology Chemistry**. Vol 286, pages 24508–24518, 2011.

5. Boggaram V1, Gottipati KR, Wang X, Samten B. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. **Journal Biology Chemistry**. Vol 288(35), pages 25500-11, 2013.

6. Goldsack L, Kirman JR. Half-truths and selective memory: interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. **Tuberculosis.**Vol 87:465–73*,* 2007.

7. Lalvani A, Millington KA. T .Cells and Tuberculosis: Beyond Interferon-gamma. J **Infectious Disease**. Vol. 197, pages 941–3, 2008.

8. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **N Engl Journal Med**; Vol 345, pages1098–104, 2001.

9. Verreck FA, de Boer T, Hoeve M, et al. Human host defense and cytokines in mycobacterial infectious diseases: interleukin-18 cannot compensate for genetic defects in the interleukin-12 system. **Clinical Infectious Disease**. Vol 35, pages 210–2, 2002

10. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nature Immunology**.; Vol **8**. Pages 369–77, 2007.

11. Mihret M; Abebe M. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Tuberculosis. **Journal Mycobacterial Diseases. Vol.** 3, pages 1-4 2013.

12. Tebruegge M. et al. Mycobacteria-specific Cytokine Responses Detect TB Infection and Distinguish Latent from Active TB. **American Journal Respiratory Critical Care Medice.** Vol 11, 2015.

13. Søndergaard N.J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* promotes T_h17 expansion *via* regulation of human dendritic cells toward a high CD14 and low IL-12p70 phenotype that reprograms upon exogenous IFN-γ. ***International Immunology.*** Vol 26, pages *705-716, 2014.*

14. *Yu C. et al.* Factors Associated With *In Vitro* Interferon-gamma Production in Tuberculosis. **Journal Formos Medical Association**. Vol 110, pages 239-246, 2011.

ARTIGO 03

A GLUTAMINA PODE SER UM BOM IMUNOMODULADOR PARA A RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE?

Autores: [1]Rosalina Guedes Donato Santos; Songeli Menezes Freire [2]Marilda Casela, , Alex Torres, [4] Eduardo Martins Netto, [5]Roberto Meyer , [6]Lucas Pedreira de Carvalho, Geraldo Sampaio Pedral[7] Andre Ney Menezes Freire.

1. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT ; Faculdade da Ciência e Tecnologia. 2- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT; Hospital Otávio Mangabeira. 3- Professora Universidade Estadual da Bahia -4- Professor da Faculdade de Medicina UFBA; Médico Hospital das clínicas e Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose. 5- Professor Titular da Universidade Federal da Bahia; Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular-6-Professor da Universidade Federal da Bahia; ; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT. 7- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular 8- Professora da Universidade Federal da Bahia; Professora da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública ; Membro do INCT-DT/CNPq/MCT.

Resumo

Introdução: A Tuberculose e a desnutrição estão interligadas, na complicação da infecção pelo Mycobacterium tuberculosis. A infecção pode causar desnutrição por meio do aumento das demandas metabólicas e diminuição da ingestão, e as deficiências nutricionais podem agravar a doença, ou atrasar a recuperação por diminuir o aporte de células do sistema imune para os sítios da infecção. **Objetivo**: Avaliar a expressão de linfócitos T totais e subpopulações e quantificação das citocinas *in vitro* pós adição da glutamina. **Métodos**: Foram estudados nesse trabalho 23 indivíduos sendo 09 do grupo teste tuberculínico negativo sem história de contato com tuberculose e 14 sintomáticos respiratórios com BAAR e ou cultura positivos. Todos os indivíduos foram triados em centros de referência para a tuberculose. Foram analisados *in vitro* a resposta celular e expressão dos marcadores para linfócitos totais e subpopulações linfocitárias à antígenos específicos e inespecíficos após a suplementação com glutamina a 40 mM. No sobrenadante do estímulo também foram testadas as citocinas IP-10, IFN-GAMA, TNF, IL-6, IL-4 e IL-10 por CBA. O número de leucócitos totais e linfócitos foram reduzidos nos indivíduos com tuberculose ativa ($p<0,05$) enquanto que o número de neutrófilos e monócitos foram elevados em relação ao grupo sem doença ($p<0,05$). A expressão dos marcadores CD45, CD3 foi mais alta nos indivíduos com tuberculose ($P<0,001$) quando comparados antes e após a adição da glutamina *in vitro.* A produção de IP-10 foia mais expressiva ($p<0,001$) no grupo sintomático respiratório, baciloscopia e ou cultura positivos. **Conclusão:** O aumento da expressão

das moléculas de superfície CD3, CD45 pode indicar um novo caminho para auxílio no tratamento de tuberculose pulmonar humana.

Palavras chaves: Glutamina, tuberculose, marcadores de linfócitos.

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis and malnutrition are interlinked, the complication of infection by Mycobacterium tuberculosis. The infection can cause malnutrition by increasing the metabolic demands and decreased intake, and nutritional deficiencies may exacerbate the disease, or delay recovery by reducing the immune cells supply to the infection sites. Objective: To evaluate the expression of total T lymphocytes and subpopulations and quantification of cytokines in vitro after addition of glutamine. Methods: We studied 23 subjects in this study and 09 negative tuberculin skin test group with no history of contact with TB and 14 with respiratory symptoms or positive AFB and culture. All individuals were screened in reference centers for tuberculosis. They were analyzed in vitro cellular response and expression of markers to total lymphocytes and lymphocyte subpopulations to specific and non-specific antigens after supplementation with glutamine 40 mM. In the supernatant of the stimulus were also tested IP-10 cytokine, IFN-gamma, TNF, IL-6, IL-4 and IL-10 by CBA. The total number of leukocytes and lymphocytes were reduced in individuals with active TB ($p < 0.05$) while the number of neutrophils and monocytes were high compared to those without the disease ($p < 0.05$). The expression of the markers CD45, CD3 was higher in patients with tuberculosis ($P < 0.001$) when compared before and after the addition of glutamine in vitro. The production of IP-10 foia greater ($p < 0.001$) in the group respiratory symptoms, and smear or culture positive. Conclusion: The increased expression of surface molecules CD3, CD45 may indicate a new way to aid in the treatment of human pulmonary tuberculosis.

Key words: Glutamine, tuberculosis, lymphocyte markers.

Introdução

Tuberculose e desnutrição estão interligadas, pois, a infecção pode causar desnutrição por meio do aumento das demandas metabólicas e diminuição da ingestão, e deficiências nutricionais podem agravar a doença, ou atrasar a recuperação por diminuir o aporte de células do sistema imune para os sítios da infecção. (Sinclair D. et al 2011). Os fatores de risco para a progressão da doença são de origem intrínseca e extrínseca. Os fatores extrínsecos são de origem social e comportamental como tabagismo, álcool e poluição do ar interior. (10.I. Romieu and C. Trenga, 2001). Os fatores que aumentam a progressão da infecção com a doença são principalmente endógenos como co-infecção com o HIV e má nutrição , eses fatores impactam no aumento da incidência e prevalência da tuberculose.(Narasimhan et al, 2013). A nutrição parenteral com glutamina é usada em pacientes com doenças críticas. A administração oral é feita com uma mistura aquosa de aminoácidos devido à instabilidade da glutamina. (Souba *et al*, 1990). Lin e et al (2002) estudando o efeito da suplementação da glutamina em pacientes em estados de doença crônica observaram que houve um aumento significativo de células TCD4+. Esses resultados também foram vistos por Li *et al* (1997) que mostrou em estudos *in vivo* com animais que a depressão de células CD4+/CD8+ foi restabelecida após a administração com a glutamina. Chang *et al* (1999) estudando a proliferação de linfócito após a administração da glutamina em células mononucleares do sangue periférico em indivíduos saudáveis demonstrou que a glutamina aprimora a capacidade de proliferação dos linfócitos, aumenta a produção

de ROS intracelular e bloqueia a síntese de GSH (glutamina exógena) e eleva a produção de ROS pós o estímulo com PHA (phitohemaglutinina). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de linfócitos T totais e subpopulações e quantificação das citocinas *in vitro* pós adição da glutamina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA 119/2011.

Seleção da População de estudo

Os indivíduos participantes do estudo foram selecionados e diagnosticados no Hospital Especializado Otávio Mangabeira (HEOM) e no Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose (IBIT), segundo os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Todos os voluntários da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de Inclusão: Participantes de ambos os gêneros com idade entre 18 e 65 anos, com diagnóstico de TB sem tratamento, Tb infecção latente e indivíduos controle negativo.

Grupo 1 Sadios (n=9): Participaram desse grupo indivíduos com TST não reator, sem história de contato com pacientes bacilíferos, sem clínica de tuberculose, vacinados (BCG) ou não.

Grupo 2 TBnRx (n= 14): Formado por indivíduos recém diagnosticados com tuberculose pulmonar e que não estavam em tratamento, TST ≥ 5 mm, baciloscopia positiva, vacinados (BCG) ou não, radiografia de tórax compatível com tuberculose ou cultura positiva para Mtb.

COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Para cada indivíduo participante do estudo foi coleta 6 mL de sangue por punção venosa, sendo 1 mL para cada um dos 6 tubos fornecidos pelo Kit QFT-IT. A três desses tubos foram adicionados glutamina (Dipeptiven) na concentração de 40 mM (concentração determinada a partir de protocolo de rotina para uso de tratamento de paciente *in vivo*). Após processados, segundo as normas do fabricante, o sobrenadante foi estocado a -70º para as dosagens posteriores de citocinas. Após a coleta todos os participantes da pesquisa realizaram HIV e permaneceram na pesquisa apenas os indivíduos HIV negativos.

DOSAGEM DE IFN-γ PELO KIT QUANTIFERON (QTF)

A quantificação de IFN-γ foi feita utilizando o kit comercial QTF (Cellestis®) seguindo as recomendações do fabricante. As interpretações dos dados foram feitas no software de análise da empresa.

MARCAÇÃO DOS FENÓTIPOS

Após a incubação das células por 24 horas foi retirado um volume de 25 ul de cada estímulo com e sem glutamina e a marcação foi feita segundo o fabricante dos anticorpos. Foram analisados os fenótipos celulares dos linfócitos T totais, TCD4, TCD8 e linfócito B. Para a marcação foram utilizados os marcadores multitest- BD (CD3 FITC, CD4 APC, CD8 PE e CD45 PERcP), CD19 (PE- BD) e CD20 (FITC- BD). A leitura foi feita com no máximo 48 horas de marcação e as células foram preservadas no paraformoldeído a 5%. A aquisição foi feita no FACS CALLIBUR (BD) e a interpretação dos dados foi realizada no software DAKO CYTOMATION (versão 5.0).

DOSAGEM DAS CITOCINAS IP-10, IFN-GAMA, TNF, IL-6, IL-4, IL-10 POR ARRAY BEAD CYTOKINE (CBA)

Todas as dosagens foram feitas seguindo a recomendação do kit BD sendo as amostras diluídas 1:2 e a posteriores a correção da diluição foi feita para os ajustes da concentração final das citocinas. As análises foram feitas no software disponibilizado pela empresa do kit.

ANÁLISE ESTATISTICA

As características da população de estudo foram feitas utilizando análises descritivas. As diferenças na análise estatística foram realizadas utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 5.0 e SPSS versão 19. As comparações entre os grupos foram feitas com o teste de Mann Whitney- U.

Resultados

Foram estudados 23 indivíduos sendo 09 indivíduos do grupo controle com cerca de 06 (66,7%) participantes do gênero feminino e 3 (33,3%) do gênero masculino e no grupo com tuberculose ativa participaram 14 indivíduos sendo 12 (87,5%) do gênero masculino e 2 (12,5 %) do gênero feminino. A média de idade foi de 34,7 anos. A análise da marcação das células está descrita nas tabelas 02,03 e 04. Foram feitas análises intragrupos e intergrupos utilizando o teste de Mann Whitney-U e foi considerado estatisticamente significante quando $p<0.05$. Foi demonstrado nesse estudo que a glutamina na condição basal pode influenciar aumentado a expressão dos marcadores CD45 e CD19 e diminuindo a expressão dos marcadores CD8 como descrito na tabela 01. Na tabela 02 há um aumento da expressão dos linfócitos TCD4 no grupo tuberculose quando avaliados na ausência e presença da glutamina. Há uma diminuição significativa na expressão dos linfócitos TCD8 no grupo controle com adição ou ausência da glutamina e uma diminuição da expressão do CD20 no grupo tuberculose com e sem glutamina. Quanto aos antígenos específicos descritos na tabela 03 há um aumento da expressão do CD45 quando comparamos entre os grupos tuberculose e controle bem como no grupo sem infecção. Enquanto que a expressão do LTCD8 diminui no grupo controle e a expressão do linfócito CD20 aumenta no grupo com tuberculose.

Análise do número global de células

O número de leucócitos totais e linfócitos encontravam-se reduzidos nos indivíduos com tuberculose doença (p<0,05) enquanto que o número de neutrófilos e monócitos foram elevados em relação ao grupo sem doença (p<0,05). Os dados dos números globais e percentuais dos leucócitos estão sumarizados na tabela 01.

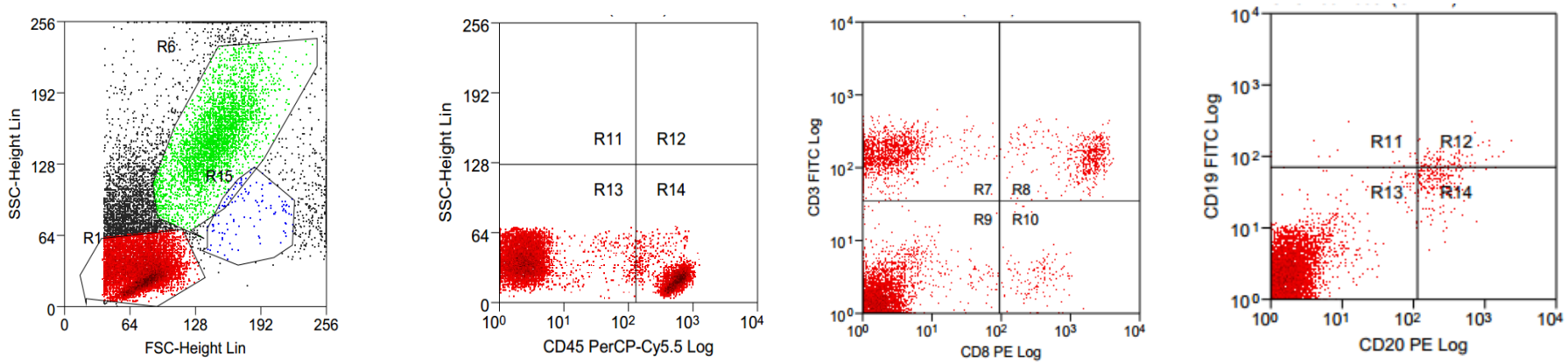
Tabela 01. Valores absolutos e relativos dos leucócitos totais do sangue periférico de indivíduos com tuberculose e sem a doença

	Grupo controle (N=9)						Grupo tuberculose (N=14)						
	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	ICQ	DP	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	ICQ	DP	Valor de p
Leucócitos totais	4770	10300	6866	6220	5520- 10300	1910	6160	14400	9601	9430	6160- 14400	2275	P<0.05
Neutrófilos (valor absoluto)	2445	6108	3811	3185	2445- 6108	1467	3394	11689	7038	6517	3394- 11689	2287	P<0.05
Neutrófilos (%)	44.3	64.8	54.29	53.2	44.30- 64.80	7.109	52.9	83.1	72.08	73.05	52.9-83.10	9.763	P<0.05
Linfócitos(valor absoluto)	1312	3306	2136	2199	1312-3306	676.2	866	2779	1488	1292	866- 2779	538.6	P<0.05
Linfócitos (%)	19.7	42.5	32.55	31.7	19.7-42.50	8.769	8.2	35.3	16.41	12.9	8.2-35.30	7.493	P<0.05
Monócitos (valor absoluto)	26.4	1212	520.6	516	26.4-1212	358	420	1306	785.9	741	420-1306	275.6	P<0.05
Monócitos (%)	5.2	16.9	9.242	8.325	5.2-16.90	4.074	4.2	21.2	8.521	7.7	4.2-21.20	3.924	P<0.05
Eosinófilos (valor absoluto)	56	515	240.4	203	56-515.0	167.8	0	1117	185.4	47.5	0-1117	307.2	
Eosinófilos (%)	0.68	10.8	3.973	2.6	0.68-10.80	3.538	0	9.8	2.107	0.6	0-9.8	3.004	
Basófilos (valor absoluto)	30	154	73.57	57	30-154.0	44.07	22	560	120.5	86	22-560.0	124.5	
Basófilos (%)	0.5	2.15	1.086	0.8	0.5-2.150	0.6297	0.3	5.28	1.197	0.935	0.3-5.280	1.131	

As análises entre os grupos foram feitas utilizando o teste de Mann Whitney -U

Expressão dos marcadores celulares (LTtotais, T helper, Tcitotóxico e linfócito B)

A expressão dos marcadores CD45, CD3 foi mais alta nos indivíduos com tuberculose (P<0,001) quando comparados antes e após a adição da glutamina *in vitro*. Entretanto alguns marcadores de superfície parecem não sofrer alteração quando na presença da glutamina. Neste modelo de estudo pode-se observar que todos os pacientes foram responsivos ao estímulo inespecífico PHA com o aumento da expressão dos marcadores linfocitários como mostrados na tabela 02. A figura 1 mostra um plot dos dados desse estudo.



a) b) c) d)

Figura 1: Gráficos representativos utilizados na identificação das células sanguíneas por tamanho (FSC) e granulosidade/ complexidade (SSC) .No gráfico A os ´´gates´´ e no gráfico B a marcação para os linfócitos totais (CD 45- APC) gerados nos experimentos desse trabalho. Marcação para os linfócitos TCD4 no gráfico C (CD3 FITC e CD4 APC) , marcação para os linfócitos TCD8 no gráfico B (CD3 FITC e CD8 PE) e marcação para os linfócitos B descrito no gráfico C (CD19FITC e CD20 PE).
Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 02. Número de células e média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais, helper , citotóxico e linfócitos B nos grupos controle e tuberculose.

	Grupo controle						Grupo Tuberculose						
	Basal sem glutamina			Basal com glutamina			Basal sem glutamina			Basal com glutamina			p<0.05
	Mediana[a]	Mínimo	Máximo	Mediana [b]	Mínimo	Máximo	Mediana [c]	Mínimo	Máximo	Mediana [d]	Mínimo	Máximo	
Nº de células CD 45+	545,5	1591	7312	621,5	1456	4683	623,8	679	5234	673	1714	6635	
MIF CD45+	700,1	346,3	801.7	679,1	363	826,2	648,9	258	7312	664	484,7	818,2	
Nº de células CD3- CD45+	151,9	1205	2690	673	987	3023	178,2	513	2021	621,5	917	3330	*ab
MIF CD3- CD45+	258,5	167,2	296	545,5	132,9	290	215	135,4	663,5	193,6	140,7	140,7	
Nº de células CD3+CD45+	748,9	1219	2737	869,7	877	3060	681,4	519	465,3	748,8	946	3351	*aa *ab *cd
MIF CD3+CD45+	818	1219	2737	869,7	581,7	871,2	784,4	2017	859,5	788,4	499,4	814	
Nº de células CD3+CD4+	733,1	654	2071	698,7	359	1935	783,7	516	2072	771,2	346	2002	
MIF CD3+CD4+	345	83,99	326,2	398	80,33	305,1	567	148,2	391,2	678	146,4	312,6	
Nº de células CD3+CD8+	1969	194	583	2115	74	1200	2483	146	1196	2368	250	1192	*aa *ab
MIF CD3+CD8+	1800	76,86	249,9	1200	1326	2487	2200	123,4	355,5	2800	127,4	282,3	
Nº de células CD19+CD20+	300	22	505	325	2	722	456	12	327	567	2	141	*aa *ab
MIF CD19+CD20+	200	429,1	2034	234	223,7	920	345	352,3	1152	419	85,58	1272	

As análises foram feitas intra e intergrupos usando o teste de Mann- Whitney-U. Para a comparação das mediadas usamos as letras a(Basal sem glutamina grupo controle) b (basal com glutamina grupo controle) c(basal sem glutamina grupo tuberculose) e d (basal com glutamina grupo tuberculose).

Tabela 03. Número de células e média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais, helper , citotóxico e linfócitos B nos grupos controle e tuberculose.

	Grupo controle						Grupo Tuberculose						
	Mitógeno sem glutamina			Mitógeno com glutamina			Mitógeno sem glutamina			Mitógeno com glutamina			p<0.05
	Mediana[a]	Mínimo	Máximo	Mediana[b]	Mínimo	Máximo	Mediana[c]	Mínimo	Máximo	Mediana[d]	Mínimo	Máximo	
Nº de células CD 45+	889	1138	4891	679,1	1291	4012	1234	539	5856	623,5	689	2234	
MIF CD45+	765	426,5	914,3	834	246,3	401.7	768	426,5	914,3	679	278	3312	
Nº de células CD3- CD45+	700,1	701	3687	162,7	238	3313	643,1	1121	3206	186	382	3857	*aa
MIF CD3- CD45+	577,4	130,3	183	345	122,7	193,4	568,5	117,1	291,7	443	99,01	295,01	
Nº de células CD3+CD45+	983,4	417	3722	919,4	247	3344	803,6	1121	3386	791,1	379	3883	*cd
MIF CD3+CD45+	151,9	620,8	965,1	845	612,5	982,8	178,2	432,2	917,8	945	454,7	960,4	
Nº de células CD3+CD4+	521,8	359	1935	485	115	24331	696,2	651	1643	678,6	257	2419	*cd
MIF CD3+CD4+	448,2	80,33	305,1	430,1	184	644,5	532,3	118,1	315,1	486,1	237,7	729,1	
Nº de células CD3+CD8+	2308	36	907	1895	68	852	2088	240	2110	1794	68	1663	*aa *ab
MIF CD3+CD8+	2194	964,4	2345	1738	992	2599	1928	1059	2111	1617	1200	2299	
Nº de células CD19+CD20+	110	3	684	34	1	757	234	1	132	45	0	121	*bb *ab
MIF CD19+CD20+	56	270,1	2539	213	50,48	803,7	59	89,77	1981	123	0	1202	

As análises foram feitas intra e intergrupos usando o teste de Mann- Whitney-U. Para a comparação das mediadas usamos as letras a(Basal sem glutamina grupo controle) b (basal com glutamina grupo controle) c(basal sem glutamina grupo tuberculose) e d (basal com glutamina grupo tuberculose).

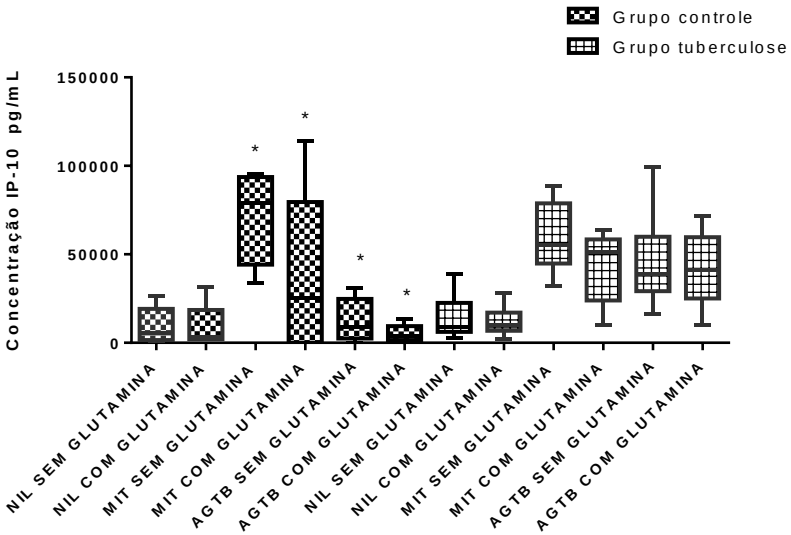
Tabela 04. Número de células e média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais, helper , citotóxico e linfócitos B nos grupos controle e tuberculose.

	Grupo controle						Grupo Tuberculose						
	AGTB sem glutamina			AGTB com glutamina			AGTB sem glutamina			AGTB com glutamina			p<0.05
	Mediana[a]	Mínimo	Máximo	Mediana [b]	Mínimo	Máximo	Mediana [c]	Mínimo	Máximo	Mediana [d]	Mínimo	Máximo	
Nº de células CD 45+	673	4356	483	659,4	8138	3891	575,9	1714	3635	623,9	339	5856	
MIF CD45+	545,5	3163	36,2	648,1	526,5	514,3	567,5	184,7	118,2	602,6	726,5	914,3	
Nº de células CD3- CD45+	345	823	11326	211,6	440	3746	445	1714	6763	196,7	980	4855	
MIF CD3- CD45+	639,5	447,4	847,8	614,4	59,34	313,2	622,7	484,7	818,2	586,1	148,2	391,2	
Nº de células CD3+CD45+	261,1	787	5556	831,1	440	3746	197,8	993	4940	797,1	641	9226	
MIF CD3+CD45+	886,9	64	319,1	506	59,34	313,2	824,5	502	849,5	456	500,4	869,2	*aa *ac
Nº de células CD3+CD4+	710,1	323	3775	667,4	219	2797	795,4	516	2072	809,3	448	2971	*ac
MIF CD3+CD4+	566,2	68,19	348,8	563,3	244,2	703,5	623,2	270,2	763,7	603,4	249,6	742,3	*aa
Nº de células CD3+CD8+	2230	68	1228	1914	54	889	1901	246	3295	1849	127	6245	
MIF CD3+CD8+	2016	1463	2971	1765	1380	2639	1730	1437	2727	1675	1370	2181	*aa *ab
Nº de células CD19+CD20+	134	2	1164	234	0	1124	137	79	162	187	1	156	
MIF CD19+CD20+	48	31,91	997,2	122	0	907,4	67	114,9	1030	34	226,4	1486	*cd

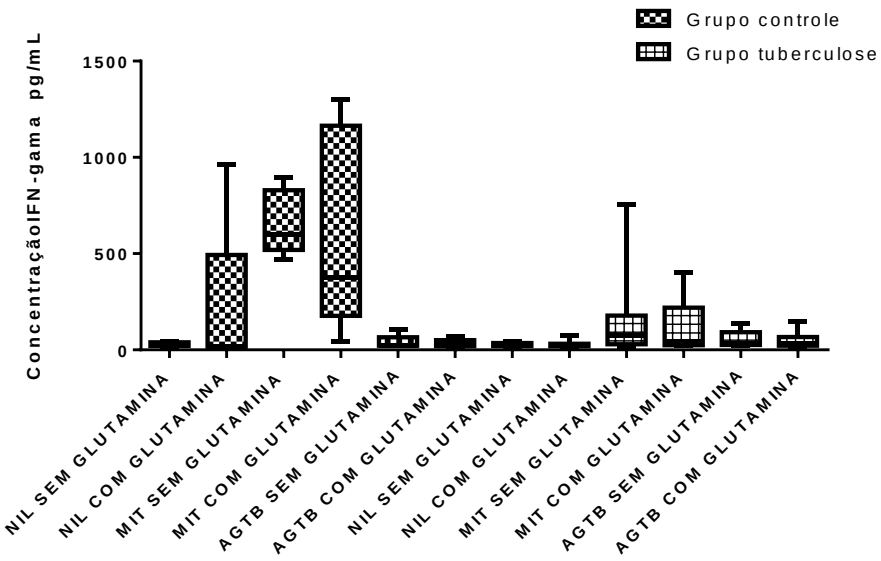
As análises foram feitas intra e intergrupos usando o teste de Mann- Whitney-U. Para a comparação das mediadas usamos as letras a(Basal sem glutamina grupo controle) b (basal com glutamina grupo controle) c(basal sem glutamina grupo tuberculose) e d (basal com glutamina grupo tuberculose).

Análise das citocinas

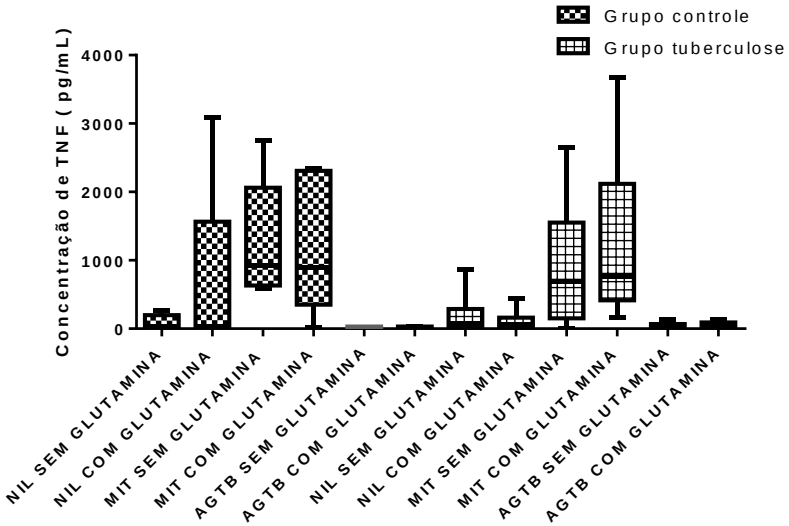
A produção de citocinas em sobrenadante de estímulo *in vitro* de sague total foi determinada em um único tempo nos controles e no grupo tuberculose. Dos 23 indivíduos a produção de citocinas foi maior no grupo com tuberculose sendo IP-10 e IFN-gama as citocinas de maior distribuição (p<0,001). Os valores das citocinas a seguir estão apresentados em média e desvio padrão, sem e com estímulo específico na presença e ausência da glutamina nos grupos sem doença e com doença, respectivamente: os níveis de IP-10 (pg/mL): (4502± 2448; 4293 ± 2006; 12715 ± 12347; 5208 ± 4940) IFN-gama (58, 21± 40, 20; 52, 08 ± 46, 04; 39,07 ± 36,80) TNF (50,22 ± 41,30; 25,72 ± 7,064; 26,28 ± 6,059) IL-4 (12,06 ± 12,85; 18,69 ± 3,7; 16,03± 2,5), IL-6 (1801 ± 1937; 2009 ± 1760; 1128 ± 898,2; 771,5 ± 673,1) e IL-10 (43,99 ± 9,9; 41,99 ± 7,6; 36,72 ± 3,4 ; 36,7 ± 3,2).


Grupo controle
Grupo tuberculose
Concentração IP-10 pg/mL
150000
100000
50000
0
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA

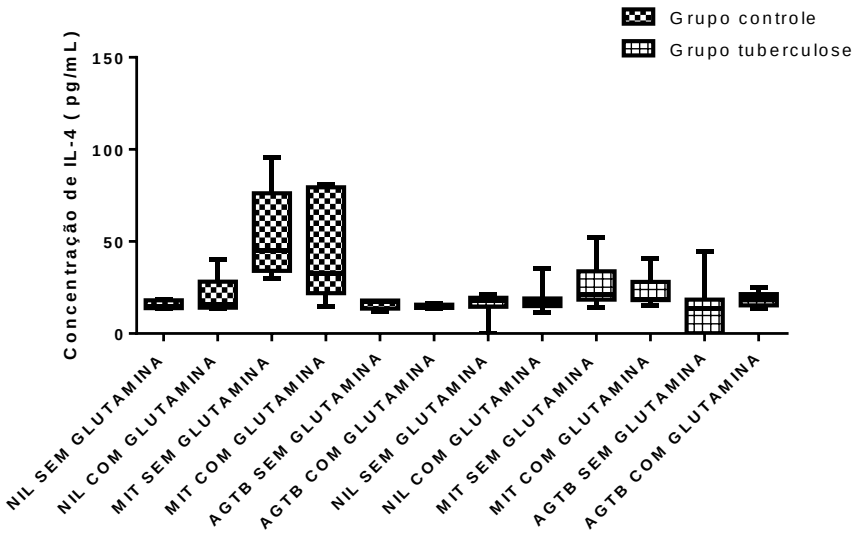
a)


Grupo controle
Grupo tuberculose
ConcentraçãoIFN-gama pg/mL
1500
1000
500
0
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA

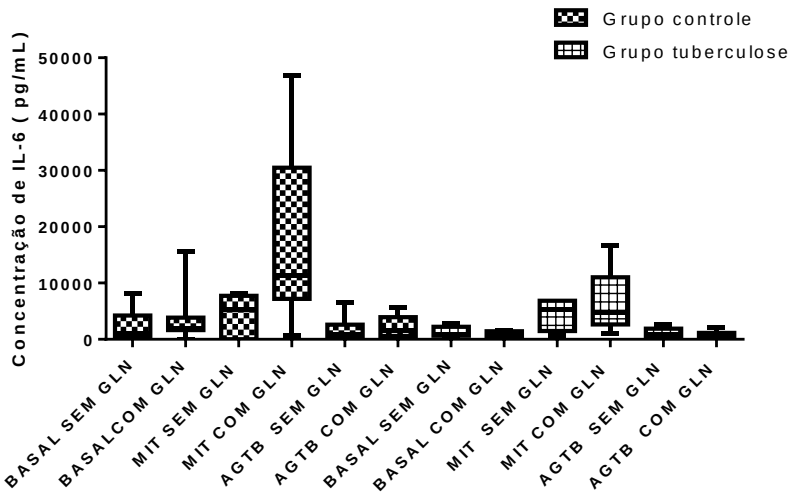
b)


Grupo controle
Grupo tuberculose
Concentração de TNF (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA

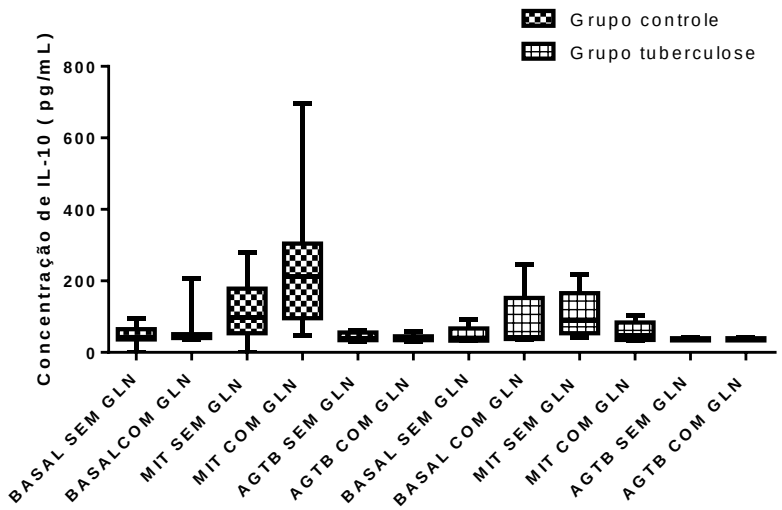
c)


Grupo controle
Grupo tuberculose
Concentração de IL-4 (pg/mL)
150
100
50
0
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA
NIL SEM GLUTAMINA
NIL COM GLUTAMINA
MIT SEM GLUTAMINA
MIT COM GLUTAMINA
AGTB SEM GLUTAMINA
AGTB COM GLUTAMINA

d)



e)



f)

Gráfico 01. Boxplot representativo das concentrações de citocinas dosadas por CBA (BD- array bead cytokines) no FACS CALLIBUR em a) IP-10 b) IFN-gama c)TNF d) IL-4 e) IL-6 f) IL-10 no plasma de indivíduos com tuberculose ativa (N=14) e sem história de contato e sinais de tuberculose pulmonar humana- PPD e IGRA negativo (N=09) pós estímulo com os antígenos inespecíficos (Phytohemaglutinine - PHA) e antígenos específicos do Mycobacterium tuberculosis . * $p<0,05$. As análises de comparação foram feitas utilizando o teste de Mann Whitney-U.

Discussão

CD3, marcador que está presente na superfície dos linfócitos T, foi encontrado aumentado principalmente nos estímulos inespecíficos e específicos após a suplementação da glutamina *in vitro* nos pacientes com tuberculose em relação ao grupo sem doença. Esse dado é interessante uma vez que a molécula CD3 é responsável por fazer a transdução de sinal e regular a ativação dos linfócitos T. (Weiss A, 1994).

CD45 é uma glicoproteína transmembrana específica dos leucócitos e receptor da tirosina fosfatase. Também é uma molécula responsável por sinalizar a ligação entre o receptor FC dos mastócitos e dos receptores tipo TOLL (TLR) aos antígenos fazendo um link entre a imunidade inata e a adquirida. (Johnson P. et al. 21010). Sendo a tuberculose uma doença que leva a interação entre a imuidade inata e adquirida a expressão do CD45 e do CD3 aumentada no grupo doença após a suplementação da glutamina nos leva a questionar se há uma maior quimiotaxia de células inflamatórias para o sítio da infecção? Há uma maior ativação dos linfócitos T especialmente referente à resposta TH1?

Neste trabalho foi visto que há uma maior produção de IFN-gama e IP-10 nos estímulos específicos e inespecíficos quando se compara antes e após a adição da glutamina *in vitro*. Isso nos sugere que a glutamina pode influenciar no aumento destas citocinas o que pode potencializar a resposta do hospedeiro contra o *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto observou-se uma dowregulation na produção de IP-10 pós adição da glutamina. Resultados similares foram visto por MARION et al, 2004 que trabalhando

com células epiteliais em humanos e dosando citocinas como IL-8, Mig, IP-10 and I-TAC no soro desses pacientes observou uma diminuição dessas proteínas.

A produção aumentada do IP-10 também foi vista por Wergeland e colaboradores (2015) que trabalhando com pacientes com tuberculose e HIV positivos demonstrou um aumento do IP-10 após o estímulo *in vitro* com os antígenos do IGRA sobretudo nos pacientes com tuberculose. (Wergeland et al, 2015). Talvez o IP-10 possa ser considerado um marcador melhor para doença uma vez que essa molécula existe em maior quantidade sérica o que facilitaria a sua dosagem laboratorial e interpretação clínica.

Têm sido demonstrado que níveis de IP-10 podem aumentar em bacteremia, tuberculose e infecções virais como HIV e hepatite C e parece que o seu aparecimento no plasma não está diretamente ligado com a gravidade da inflamação. (Mihret et al 2013; Askarieh et al 2010; Keating et al 2011; Stylianou et al 2000).

Nesse estudo nós encontramos uma menor quantidade de células TCD4 em relação às células TCD8 já visto por nosso laboratório por Leão et al 2014. A discordância entre a contagem de células CD4 e a produção de IP-10 pode ser explicada pelo fato de que há mais moléculas IP-10 circulantes do que a de IFN-gama. (Liovat et al, 2012).

Em conclusão, no modelo *in vitro* a glutamina parece modular positivamente a resposta imune pelo aumento da expressão dos marcadores CD3 e CD45 e causar uma dowregulation das proteínas IP-10 e IFN-gama o que pode ser benéfico a longo prazo pois diminui a intensidade da resposta inflamatória.

Referências Bibliográficas

1. Sinclair D. et al. Nutritional supplements for people being treated for active tuberculosis. **Cochrane Library.** Vol 1 ,Pages 1-143, 2011.

2. Romieu and C. Trenga, “From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis,” Epidemiologic Reviews, vol. 23, no. 2, pp. 288–301, 2001.

3. Narasimhan P. et al. Risk Factors for Tuberculosis. **Pulmonary Medicine.** Vol 2013, pages 1-11, 2013.

4. Weiss A, Littman DR (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 76:263–274.

5. Johnson P. et al. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. Cellular Signalling. Vol 22 , pages 339–348, 2010.

6. Wergeland et al. IP-10 differentiates between active and latent tuberculosis irrespective of HIV status and declines during therapy. Journal of Infection. Volume 70, Issue 4, April, Pages 381–391, 2015.

7. G. Askarieh, A. Alsio, P. Pugnale, F. Negro, C. Ferrari, A.U. Neumann, et al.Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C Hepatology, 51 (5) (2010 May), pp. 1523–1530

8. S.M. Keating, E.T. Golub, M. Nowicki, M. Young, K. Anastos, H. Crystal, et al.The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women AIDS, 25 (15) (2011 Sep 24), pp. 1823–1832

09. E. Stylianou, P. Aukrust, K. Bendtzen, F. Muller, S.S. Froland Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-

possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection Clin Exp Immunol, 119 (3) (2000 Mar), pp. 479–485.

10. Mihret, Y. Bekele, K. Bobosha, M. Kidd, A. Aseffa, R. Howe, et al.Plasma cytokines and chemokines differentiate between active disease and non-active tuberculosis infection J Infect, 66 (4) (2013 Apr), pp. 357–365.

11. A.S. Liovat, M.A. Rey-Cuille, C. Lecuroux, B. Jacquelin, I. Girault, G. Petitjean, et al.Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection PLoS One, 7 (10) (2012), p. e46143.

12. Marion R[1], Coëffier MM, Gargala G, Ducrotté P, Déchelotte PP. Glutamine and CXC chemokines IL-8, Mig, IP-10 and I-TAC in human intestinal epithelial cells. Clinical Nutrition. Aug;Vol 23(4), pag.579-85, 2004

4.0 CONCLUSÕES

O IGRA parece ser um bom teste preditivo de doença para indivíduos PPD negativo por ser um teste de maior sensibilidade e especificidade diagnóstica.

IFN-gama foi a citocina com um maior poder de distinção entre os grupos com infecção latente e com tuberculose doença.

O interferom gama mostrou sensibilidade maior que as outras citocinas testadas nesse estudo.

Na tuberculose doença observa-se uma diminuição dos leucócitos totais e linfócitos enquanto o número de neutrófilos e monócitos aumentam de forma gradativa associada a quantidade de BAAR encontrada.

IP-10 pode ser um bom marcador sobretudo em pacientes com doença devido a sua maior circulação em relação ao IFN-gama.

A suplementação *in vitro* com glutamina modula aumentando os marcadores de superfície CD3 e CD45 com papel importante na transdução de sinal e na ativação leucocitária.

No modelo *in vitro* a glutamina parece modular negativamente a resposta imune do perfil Th1 pela diminuição na produção das citocinas IP-10 e IFN-gama.

LISTA COMPLETA DAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE

1. Comstock GW. False tuberculin test results. Chest.1975;68:465–9.
2. Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F. Influence of BacilleCalmette-Guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction to what size? Clinical Infectious Disease. 2005;40:211–7
3. Grabau C.J; DiFerdinando T.G.; Novick F.L. False Positive Tuberculosis Skin Test Results. **Public Health Reports. 1995.**110 : 703-706.
4. Stuart RL, Bennett N, Forbes A, Grayson ML. A paired comparison of tuberculin skin test results in health care workers using 5 TU and 10 TU tuberculin. Thorax. 2000;55:693–5.
5. . Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection. United States. MMWR Recomm Rep. 2005;54:49–55.
6. WHO. WORLD Health Organization. Global tuberculosis control:surveillance, planning,financing: **WHO report 2009**. WHO/HTM/TB/2008.393.Geneva, Switzerland: WHO, 2009.
7. WHO. WORLD Health Organization. Global tuberculosis control:surveillance, planning,financing: **WHO report 2014**. WHO/HTM/TB/2008.393.Geneva, Switzerland: WHO, 20014.

8. PROGRAM NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE, Ministério da Saúde*:* ***Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose noBrasil,***2010.

9. TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso.**Journal Bras Pneumology.**33(3):323-334, 2007.

10. ABRAMO C; MEIJGAARDEN E. K.; GARCIA D. ; FRANKEN C.M.L.K; KLEIN.M.;KOLK J.A.;OLIVEIRA.;OTTENHOFF M.H.T.; TEIXEIRA C.H. Monokine induced by interferon-gamma and IFN-Y response to a fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6

and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. **Revist Microbes and Infection** , v.8, p.45-51,2006.

11. Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B. & Martin, C. (2001). An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. **Molecular Microbiology** 41, 179–187.
12. Tissot F, Zanetti G, Zellweger JP, Zysset F. Influence of bacilleCalmette-Gue´rinVaccinationon size of tuberculin skin test reaction: to what size. **Clinical Infectious Disease** 2005; 40:211–7.
13. Comstock, G. W., and Palmer, C. E. Long-Term Results of B. C. G. Vaccination in the Southern United States. **Amer. Revist Respiratory Diseases**, *93:* 171-183, 1966.
14. Morán-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick DM, FitzGerald JM. Tuberculin skin test size and risk of tuberculosis development: a large population-based study in contacts. **International Journal Tuberculosis Lung Disease** 2007;11:1014-20
    a. Trajman et al. Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. **Pulmonary Medicine.** Vol 13 pages 1-13, 2013.
15. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. www.OpenEpi.com, updated 2015/05/04, accessed 2015/08/11.
16. Sinclair D. et al. Nutritional supplements for people being treated for active tuberculosis. **Cochrane Library.** Vol 1 ,Pages 1-143, 2011.
17. Romieu and C. Trenga, “From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis,” Epidemiologic Reviews, vol. 23, no. 2, pp. 288–301, 2001.
18. Narasimhan P. et al. Risk Factors for Tuberculosis. **Pulmonary Medicine.** Vol 2013, pages 1-11, 2013.
19. Weiss A, Littman DR (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 76:263–274.
20. Johnson P. et al. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. Cellular Signalling. Vol 22 , pages 339–348, 2010.

21. Wergeland et al. IP-10 differentiates between active and latent tuberculosis irrespective of HIV status and declines during therapy. Journal of Infection. Volume 70, Issue 4, April, Pages 381–391, 2015.
22. G. Askarieh, A. Alsio, P. Pugnale, F. Negro, C. Ferrari, A.U. Neumann, et al.Systemic and intrahepatic interferon-gamma-inducible protein 10 kDa predicts the first-phase decline in hepatitis C virus RNA and overall viral response to therapy in chronic hepatitis C Hepatology, 51 (5) (2010 May), pp. 1523–1530
23. S.M. Keating, E.T. Golub, M. Nowicki, M. Young, K. Anastos, H. Crystal, et al.The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women AIDS, 25 (15) (2011 Sep 24), pp. 1823–1832
24. E. Stylianou, P. Aukrust, K. Bendtzen, F. Muller, S.S. Froland Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection Clin Exp Immunol, 119 (3) (2000 Mar), pp. 479–485.
25. Mihret, Y. Bekele, K. Bobosha, M. Kidd, A. Aseffa, R. Howe, et al.Plasma cytokines and chemokines differentiate between active disease and non-active tuberculosis infection J Infect, 66 (4) (2013 Apr), pp. 357–365.
26. A.S. Liovat, M.A. Rey-Cuille, C. Lecuroux, B. Jacquelin, I. Girault, G. Petitjean, et al.Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection PLoS One, 7 (10) (2012), p. e46143.

27. Etna P.M ; Giacomini E. , Severa M. Coccia M. Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. **Seminars in Immunology.** Volume 26, Issue 6, Pages 543–551 , 2014.

28. Kinhikar A. G., Verma I., Chandra D., Singh K. K., Weldingh K., Andersen P., Hsu T., Jacobs W. R. Jr.., Laal S. Potential role for ESAT6 in dissemination of M. tuberculosis via human lung epithelial cells. **Mol. Microbiol**. Vol 75, pages 92–106, 2010.

29. Mishra B. B., Moura-Alves P., Sonawane A., Hacohen N., Griffiths G., Moita L. F.,Anes E. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cell Microbiol**. Vol.12, pages1046–1063, 2010.

30. Peng H., Wang X., Barnes P. F., Tang H., Townsend J. C., Samten B. The Mycobacterium tuberculosis early secreted antigenic target of 6 kDa inhibits T cell interferon-γ production through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal Biology Chemistry**. Vol 286, pages 24508–24518, 2011.

31. Boggaram V1, Gottipati KR, Wang X, Samten B. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. **Journal Biology Chemistry**. Vol 288(35), pages 25500-11, 2013.

32. Goldsack L, Kirman JR. Half-truths and selective memory: interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. **Tuberculosis.**Vol 87:465–73, 2007.

33. Lalvani A, Millington KA. T .Cells and Tuberculosis: Beyond Interferon-gamma. J **Infectious Disease**. Vol. 197, pages 941–3, 2008.

34. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **N Engl Journal Med**; Vol 345, pages1098–104, 2001.

35. Verreck FA, de Boer T, Hoeve M, et al. Human host defense and cytokines in mycobacterial infectious diseases: interleukin-18 cannot compensate for genetic defects in the interleukin-12 system. **Clinical Infectious Disease**. Vol 35, pages 210–2, 2002

36. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nature Immunology**.; Vol **8**. Pages 369–77, 2007.

37. Mihret M; Abebe M. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Tuberculosis. Journal **Mycobacterial Diseases . Vol** 3, pages 1-4 2013.

38. Tebruegge M. et al. Mycobacteria-specific Cytokine Responses Detect TB Infection and Distinguish Latent from Active TB. American Journal Respiratiry Critical Care Medice. Vol 11, 2015.

39. Søndergaard N.J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* promotes T_h17 expansion *via* regulation of human dendritic cells toward a high CD14 and low IL-12p70 phenotype that reprograms upon exogenous IFN-γ. ***International Immunology.*** Vol 26, pages *705-716, 2014.*

40. *Yu C. et al.* Factors Associated With *In Vitro* Interferon-gamma Production in Tuberculosis. **Journal Formos Medical Association**. Vol 110, pages 239-246, 2011.

41. Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert(®) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? Expert Rev Mol Diagn. 2010; 10(7):937-46.

42. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et. al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med; 363(11):1005-15, 2010.