



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM  
TUBERCULOSE PULMONAR**

**JÉSSICA DIAS PETRILLI**

**Salvador - BA**

**2015**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM  
TUBERCULOSE PULMONAR**

**JESSICA DIAS PETRILLI**

Orientador: Professor Dr. Sérgio Arruda

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Mestre.

**Salvador - BA**

**2015**

“AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR”

JÉSSICA DIAS PETRILLI

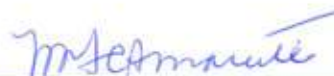
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Sara Timóteo Passos  
Pesquisadora  
UFBA



---

Dr. Maria Fernanda de Castro Amarante  
Pesquisadora Visitante  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa  
Pesquisadora  
CPqGM/FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele em que tudo posso.

A minha mãe Célia, meu amor mais puro e sincero, meu exemplo de força.

Ao meu pai Marcos, meu espelho, meu amigo, meu guia.

A minha irmã Bianca, pela compreensão e companheirismo.

Ao meu namorado Rafael, pelo amor, apoio, compreensão e muita paciência em todas as horas difíceis dessa jornada.

Ao meu orientador Dr. Sérgio Arruda, pela oportunidade de viver essa experiência, contribuição, aprendizados e confiança.

Aos colaboradores Dr. Lee Riley e Lucas Carvalho pelo o apoio científico.

Aos amigos do LASP e LHGB, a Carolina Cavalcante, Fernanda Khouri, Filipe Lima, Gisele Calazans, Iukary Takenami, Jéssica Soares, Juliana Gomes, Luana Leandro, Luciane Amorim, Marina Loyola e Théssika Hialla, pela grande ajuda durante toda essa jornada, todo o apoio e paciência. Sou muito feliz por ter conquistado amizades como a de vocês contrariando todas as probabilidades. É muito melhor o trabalho com vocês por perto.

Aos amigos do NB3, Antônio Muniz e Tonya Duarte, pelo reconhecimento e incentivo.

Aos meus familiares que estão longe, mas torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus amigos, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e acreditando em mim.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa com os quais tive a oportunidade de aprender.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz, pela oportunidade e estrutura fornecida.

A biblioteca do CPqGM/Fiocruz, em especial a bibliotecária responsável Ana Maria Fiscina, Vaz Sampaio, quem dedicou tempo e deu todo o suporte necessário para a construção final dessa dissertação.

A FAPESB, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

Muito obrigada a todos aqueles que torceram por mim!

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

*Charles Chaplin.*

PETRILLI, Jéssica Dias. Avaliação das subpopulações de monócitos em pacientes com tuberculose pulmonar. 55 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

Os macrófagos são componentes importantes da resposta imune inata contra o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e podem desempenhar um papel importante na patogênese da tuberculose (TB). Macrófagos são derivados dos monócitos, os quais são classificados em subpopulações a partir da expressão da molécula de superfície CD14 e CD16. São denominados de clássicos, intermediários e não clássicos, e possuem diferenças funcionais e fenotípicas. Os fatores que levam ao desenvolvimento de TB ativa ainda não são claros. Um desequilíbrio entre subpopulações de monócitos circulantes pode estar envolvido na imunopatogênese da TB, uma vez que macrófagos são células importantes da resposta imune inicial da doença. Assim, neste estudo avaliou-se os subgrupos de monócitos em pacientes com TB ativa e latente (TBL). Voluntários com TB ativa, TBL e indivíduos saudáveis foram recrutados para avaliação de frequência, níveis de ativação e produção de citocinas dos subgrupos de monócitos circulantes e após a estimulação antigênica por citometria de fluxo. Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas nas frequências, níveis de ativação e produções de citocinas das subpopulações de monócitos entre os grupos estudados. No entanto, pacientes com TB ativa tiveram um aumento na frequência dos monócitos clássicos ativados após estimulação antigênica comparados com os controles saudáveis. Não observou-se uma expansão das subpopulações CD16<sup>+</sup> em pacientes TB. Por outro lado, se observou uma expansão dos monócitos CD16<sup>-</sup> e maior ativação dessa subpopulação após estimulação antigênica em indivíduos TB e TBL. Diante disso, os monócitos clássicos parecem desempenhar algum papel na infecção da TB, uma vez que esta subpopulação se expande e apresenta-se mais ativada após estimulação antigênica principalmente em resposta a Mce1A. Entretanto, esta expansão de monócitos clássicos na TB ainda precisa ser avaliada

**Palavras-chave:** Subpopulação de monócitos, Tuberculose ativa, Tuberculose latente

PETRILLI, Jéssica Dias. Evaluation of monocyte subsets in tuberculosis pulmonary patients. 55 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

Macrophages are important components of the innate immune response against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and may play an important role in the pathogenesis of tuberculosis (TB). Macrophages are derived from monocytes, which are classified into subpopulations from the expression of CD14 and CD16 surface molecule. They are denominated classics, intermediate and non-classical, and have functional and phenotypic differences. The factors that lead to the development of active tuberculosis are not clear yet. However, an imbalance between subpopulations of monocytes may be involved in the immunopathogenesis of TB, since macrophages are important cells in the initial immune responses of the disease. In this study we evaluated the monocyte subsets in patients with active and latent TB (ILTB). Volunteers with active TB, ILTB and healthy subjects were recruited to evaluate the frequency, levels of activation and cytokine production of blood monocytes subsets circulating and after the antigenic stimulation by flow cytometry. Our results did not show significant differences in the frequency, activation levels and cytokine production of monocytes subsets between studies groups. However, patients with active TB have an increased of frequency and activated levels of classical monocytes after antigenic stimulation compared to healthy controls. An expansion of CD16<sup>+</sup> in monocytes subsets of TB patient was not observed. Moreover, it was observed an expansion and increased activation of CD16<sup>-</sup> monocytes after antigenic stimulation in individuals TB and LTB. Thus, the classical monocytes seems to play a role in TB infection, since this subpopulation expands and appears more active primarily after antigenic stimulation in response to Mce1A. However, this expansion of classical monocytes in TB still needs to be evaluated.

**Keywords:** Monocytes subsets, Active tuberculosis, Latente tuberculosis infection

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>CCL</b>	Ligante de quimiocina
<b>CD</b>	<i>Cluster</i> de diferenciação
<b>CEP</b>	Conselho de Ética em Pesquisa
<b>CPqGM</b>	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
<b>CTLA</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC-A</b>	Dispersão frontal relacionado com o tamanho celular
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HTLV-1</b>	Vírus linfotrópico de células T humana tipo 1
<b>H37Ra</b>	Antígeno bruto atenuado do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> avirulento
<b>IBIT</b>	Instituto Brasileiro de Investigação da Tuberculose
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LASP</b>	Laboratório Avançado de Saúde Pública
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>Mce1A</b>	<i>Mammalian cell entry protein 1A</i>
<b>MFI</b>	Intensidade média de fluorescência
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NB2</b>	Nível de biossegurança 2
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PE-CY</b>	Ficoeritrina-cianina
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PPD</b>	Derivado proteico purificado



<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SSC-A</b>	<i>Sidescatter</i> , relacionada com a complexidade celular
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TBL</b>	Tuberculose latente
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>Th1</b>	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
<b>TLR</b>	Receptores semelhantes ao <i>toll</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TST</b>	<i>Tuberculin skin test</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE.....	10
1.2	AGENTE ETIOLÓGICO .....	10
1.2.1	<b>Mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)</b> .....	11
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	12
1.4	IMUNOPATOGÊNESE .....	13
1.5	SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS .....	15
1.5.1	<b>Subpopulações de monócitos na TB</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	GERAL .....	19
2.2	ESPECÍFICOS .....	19
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	20
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE

Tuberculose (TB) é uma das mais antigas doenças infectocontagiosas crônica que acomete o ser humano. Apesar de dispor de esquemas eficazes de tratamento contra o bacilo, a TB ainda é considerada um grave problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo. No último boletim epidemiológico divulgado, vinte e dois países são responsáveis por 80 % do total de número de casos novos de TB no mundo, sendo o Brasil o ocupante do 22º lugar (OMS, 2014).

O Brasil possui o maior número de casos registrados de TB na América do Sul, com uma prevalência estimada em 57 casos por 100.000 habitantes (OMS, 2014). A TB é uma das doenças infecciosas que mais acomete a população brasileira, constituindo uma das principais causas de morbimortalidade no país. De acordo com o último boletim epidemiológico do ministério da saúde, a Bahia apresentou em 2014, 33,5 casos por 100.000 habitantes confirmados de TB, o que confere ao Estado o terceiro lugar do Nordeste e o décimo do país em número de casos novos de TB (BRASIL, 2015).

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente etiológico da TB, é do gênero *Mycobacterium* que pertence à família Mycobacteriaceae. A espécie Mtb é um bacilo delgado, aeróbico obrigatório, intracelular facultativo, sem flagelos e não formador de esporos, que parasita principalmente os macrófagos alveolares (SCHOREY; CARROLL; BROWN, 1997).

A resposta imune primária desencadeada na infecção é o fator central da imunidade protetora contra o bacilo através da interação das células infectadas com as células T. Apesar do bacilo não apresentar fatores de virulência clássicos, possui uma ação virulenta decorrente da resposta imune exacerbada do hospedeiro contra o Mtb, além da habilidade de sobrevivência

e proliferação no interior de fagócitos mononucleares do hospedeiro (SMITH, 2003; TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003). A habilidade de entrar e sobreviver dentro de células hospedeiras vem sendo investigada por muitos estudiosos na tentativa de compreender melhor os mecanismos envolvidos neste processo, sendo a proteína mammalian cell entry protein 1A (Mce1A) alvo destes estudos nos últimos 20 anos.

### 1.2.1 Proteína Mce1A

O gene promotor da Mce1A (*mce1*), assim como seu produto a Mce1A, foram descritos pela primeira vez em 1993 por Arruda e colaboradores (ARRUDA et al., 1993). A proteína é expressa na superfície celular do complexo Mtb, complexo *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium lepra* (SANTHOSH et al., 2005; SATO et al., 2007; WIKER et al., 1999). Além das micobactérias, o gene *mce1* está expresso em outras bactérias, como a *L.interrogans* (CASALI; RILEY, 2007; PARKER; TSAI; PALMER, 1995; ZHANG et al., 2012).

A Mce1A está associada a entrada e a sobrevivência do bacilo dentro da célula hospedeira. Arruda e colaboradores demonstram *in vitro* que cepas não invasivas de *Escherichia coli* recobertas com *beads* revestidas de Mce1A foram capazes de penetrar em células não fagocíticas do hospedeiro (ARRUDA et al., 1993). Corroborando com esses resultados, Flesselles e colaboradores (1999) demonstraram que a interrupção do gene homólogo a *mce1* em *Mycobacterium bovis* (BCG) diminuiu a capacidade de internalização do bacilo em células HeLa. Assim, a capacidade da proteína de viabilizar a entrada de bactérias não patogênicas em células não fagocíticas evidenciam um papel putativo do gene *mce1* na ação virulenta do bacilo (CASALI et al., 2002; CHITALE et al., 2001; EL-SHAZLY et al., 2007; LU et al., 2006).

Estudos em modelo animal demonstraram que camundongos infectados com a cepa mutante para a Mce1A, sem o gene *mce1*, apresentam a formação do granuloma de forma difusa, o que beneficia a replicação do bacilo. Além disso, Haile e colaboradores observaram que em condição de hipóxia, como no granuloma, a expressão do gene *mce1* é regulado negativamente, o que favorece a manutenção do estado de latência do bacilo (HAILE; BJUNE; WIKER, 2002).

Os fatores e a razão pelo qual o indivíduo com a forma latente da TB desenvolve a forma ativa não são claros. Entretanto, a Mce1A pode ter um importante papel na transição da doença, sendo alvo para muitos estudos nessa área. Contudo, a maioria dos estudos com Mce1A são em

modelo murino ou em células humanas de linhagem. Há poucos estudos que avaliam a resposta imune celular frente a Mce1A com células humanas.

### 1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção pelo Mtb acontece através das vias aéreas, a partir da inalação de partículas viáveis contendo o bacilo que ficam suspensas no ar por períodos prolongados, provenientes da fala, do espirro e principalmente da tosse de pacientes bacilíferos (NARASIMHAN et al., 2013). Uma vez inalado, o bacilo pode estabelecer um estado de latência (TBL), levar ao desenvolvimento da forma ativa da TB (TB primária) ou até mesmo eliminar o bacilo completamente.

Na TBL os indivíduos estão infectados pelo bacilo, mas não são capazes de transmitir a doença, além de não apresentam sinais e sintomas característicos da TB. Apresentam resultados negativo para os testes diagnósticos da TB ativa, porém apresentam reação cutânea ( $\geq 5$  mm) positiva para o teste tuberculínico (TST), principal teste utilizado para diagnóstico da TBL. O indivíduo infectado pode permanecer na forma latente da TB durante toda vida, no entanto em alguns casos o bacilo pode sofrer uma reativação ou o indivíduo pode sofrer uma nova infecção, podendo desenvolver a forma ativa da doença.

A TB ativa pode ocorrer logo após o contágio com a fonte infectante (TB primária) ou após alguns anos com a transição do estado de latência para a forma ativa (TB secundária). Na TB ativa, os indivíduos apresentam sintomas como febre, sudorese noturna, perda de peso e principalmente tosse prolongada por mais de duas semanas (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003). Os fatores que levam ao desenvolvimento da TB ativa ou TBL ainda são desconhecidos, entretanto a depender da eficiência da resposta imune do hospedeiro contra o bacilo, o sistema imune consegue controlar a infecção ou estabelecer a TBL.

Pela história natural da TB observa-se que 10 a 30% dos indivíduos infectados desenvolverão a TBL. Destes, 5 a 10% irão desenvolver a forma ativa da doença ao longo da vida, e as chances de desenvolver são maiores nos dois primeiros anos pós infecção (MCNERNEY et al., 2012). Vale ressaltar que o risco aumenta consideravelmente em pacientes co-infectados, com o HIV e o Vírus Linfotrófico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1), por exemplo, ou ainda em pacientes portadores de comorbidades como diabetes mellitus tipo I (MARINHO et al., 2005; NARASIMHAN et al., 2013). Os estudos relatam a importância

epidemiológica dessas co-infecções, entretanto pouco se compreende sobre os mecanismos que levam alguns indivíduos co-infectados a serem mais propensos ao desenvolvimento da TB. Deste modo, o esclarecimento da imunopatogênese da TB é fundamental.

#### 1.4 IMUNOPATOGÊNESE

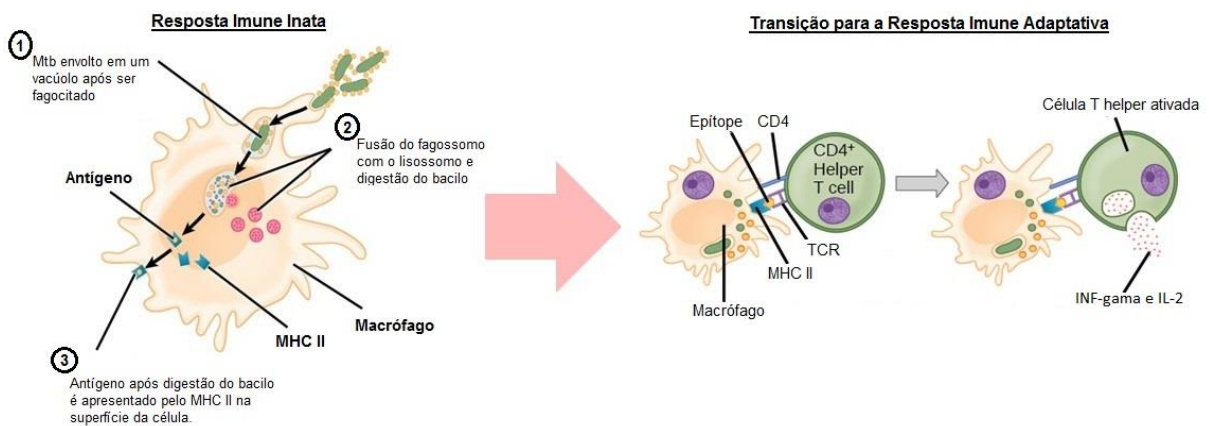
Após a inalação do bacilo, os monócitos migram pela corrente sanguínea para o local de infecção no tecido pulmonar, onde se diferenciam em macrófagos. Macrófagos alveolares reconhecem o Mtb através dos receptores *Toll-like* (TLR), a exemplo dos TLR-2 e TLR-4 e fagocitam o bacilo. Uma vez dentro do fagossoma, o bacilo é processado e antígenos bacterianos podem ser apresentados aos linfócitos T através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O controle imunológico da TB é mediado principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> que se diferenciam em células T *helper* do tipo 1 (Th1) através da interleucina-12 (IL), e nesse caso a apresentação dos antígenos acontece através do MHC classe II (HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997). Essa interação celular é crucial no controle inicial da doença, pois os linfócitos T CD4<sup>+</sup> através da liberação do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ativarão os macrófagos infectados induzindo-os a produzir reativos de nitrogênio e oxigênio capazes de inibir ou eliminar os bacilos (SMITH, 2003). As moléculas co-estimulatórias têm papel fundamental na interação celular na resposta imunológica do hospedeiro

As moléculas CD40 e MHC classe II são fundamentais para que ocorra a ativação ou inibição celular e proliferação dos linfócitos T. A apresentação antigênica ao receptor dos linfócitos T (TCR) ocorre através do MHC que irá necessitar de um segundo através do complexo de receptores e co-receptores (CD4 e CD8) e da molécula co-estimulatória (CD28) expressos nas células T para ser efetiva (SCHWARTZ, 1990). Após apresentação antigênica, uma das vias para o desenvolvimento da resposta imunológica acontece através da ligação da molécula CD40 com a molécula CD154 (CD40L) das células T ativadas (XU; SONG, 2004, p. 40). A CD40 está presente na superfície das células B, eosinófilos, células endoteliais, macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APC). No caso da TB, a via de interação CD40-CD40L é importante tanto para promoção da ativação dos linfócitos T, quanto para ativação macrofágica. Uma vez ativados por essa via, os mesmos iniciam o processo de produção de reativos de oxigênio e nitrogênio importantes para eliminação do bacilo (KLUG-MICU et al., 2013)

Os monócitos/macrófagos, bem como mediadores solúveis produzidos por eles, fazem parte da imunidade inata da TB. São células importantes, pois regulam e influenciam a natureza da resposta imune adaptativa através da apresentação de antígeno e secreções de citocinas e quimiocinas, além de participarem da formação do granuloma, responsável por conter a infecção tuberculosa em indivíduos com TBL. Células fagocíticas podem penetrar no parênquima pulmonar, iniciando um foco inflamatório para onde outros monócitos e outras células serão atraídas, acumulando-se ao redor dos bacilos e dando início a formação de um granuloma coordenada principalmente por linfócitos T (BRIGHENTI; ANDERSSON, 2012).

O granuloma é essencial para a contenção da infecção tuberculosa, já que forma uma barreira delimitando o sítio da infecção (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003). O granuloma é caracterizado por um acúmulo local de macrófagos infectados e outros não infectados que foram atraídos, células gigantes multinucleadas e macrófagos epitelióides. Todas essas células estão envoltas por um halo de linfócitos T  $CD4^+$  e  $TCD8^+$ , sendo o fator de necrose tumoral (TNF) produzida pelos linfócitos T e macrófagos responsáveis por manter a formação e estrutura desse granuloma (VAN ALTENA et al., 2011). O TNF é capaz de regular a resposta imune por ativação, migração, proliferação e indução da expressão de receptores em outras células. De uma forma ainda não compreendida, no centro do granuloma surge uma necrose caseosa, que é resultado da destruição tecidual irreversível. Estas necroses podem ser observadas através da radiografia do tórax na forma de cavernas pulmonares. A necrose possibilita que os bacilos, antes contidos pelo granuloma, sejam liberados para os bronquíolos e brônquios, facilitando a contaminação aérea e infectando novos indivíduos sadios e, desta forma, perpetuando a doença (FLÓRIDO; COOPER; APPELBERG, 2002).

Portanto, os monócitos possuem um importante papel na resposta inflamatória, sendo essenciais para o desenvolvimento não somente da resposta imune frente ao Mtb, assim como contra bactérias, fungos, parasitas e vírus (CROS et al., 2010; SKINNER et al., 2005; SOARES et al., 2006).



Fonte: Rockefeller University, adaptado pelo próprio autor.

**Figura 1.** Descrição da resposta imune inata e transição para a resposta imune adaptativa desenvolvida na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

## 1.5 SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS

Monócitos são células mononucleares derivados de precursores mielóides oriundos da medula óssea que migram através da corrente sanguínea para o sítio de inflamação aonde se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Passlick e colaboradores em 1989 classificaram os monócitos em duas subpopulações de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD14 e CD16. Os monócitos foram subdivididos em clássicos  $CD14^{high}CD16^{neg}$  ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ) e pró-inflamatórios  $CD14^{low}CD16^{high}$  ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ), atualmente conhecido como não clássicos (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1989). Entretanto, uma terceira subpopulação de monócitos com expressão intermediária de CD14 e CD16,  $CD14^{high}CD16^{low}$  ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), foi descrita por Ziegler-Heitbrock e colaboradores propondo desta forma uma nova classificação das subpopulações de monócitos em clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermediários ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) e não clássicos ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Distintos grupos de pesquisas vem estudando essas subpopulações a nível molecular e celular e observa-se que essas subpopulações possuem, além de diferenças fenotípicas, diferenças funcionais (AGUILAR-RUIZ et al., 2011; BELGE et al., 2002; CROS et al., 2010).

Os monócitos clássicos representam 85% do total do número de monócitos na circulação sanguínea (CROS, 2010; WONG, 2011; ZAWADA, 2011). Produzem citocinas como IL-6 e



IL-8 e quimiocinas como CCL2 e CCL3. Estimulados *in vitro* com lipossacarídeo (LPS) produzem altos níveis de IL-10 e baixos níveis de TNF comparados as outras subpopulações de monócitos (CROS, 2010; WONG 2011; SMEDMAN, 2012). Possuem alta capacidade fagocítica em relação às subpopulações de monócitos intermediários e não clássicos e alta atividade microbicida (CROS, ZHAO 2010; ZAWADA, 2011). Apesar de possuírem menor expressão de MHC classe II quando comparados aos monócitos intermediários, são bons ativadores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (AGUILAR-RUIZ; ZAWADA, 2011).

Os monócitos intermediários correspondem 5 a 15% do número total de monócitos na corrente sanguínea (WONG, 2011; ZAWADA, 2011). Apresentam um grau de maturação maior do que os monócitos clássicos, relacionados com a diferenciação em macrófagos e células dendríticas (AGUILAR-RUIZ, 2011). Devido à expressão de genes que codificam moléculas de MHC classe II e genes envolvidos no processamento de antígenos, os monócitos intermediários são bons apresentadores de antígenos (ZAWADA, 2011; WONG, 2011), além de expressarem marcadores de superfície relacionados à angiogênese. (ZAWADA, 2011). Muitos estudos relatam a expansão das subpopulações CD16<sup>+</sup> e sua significância clínica em diversas doenças (KAWANAKA, 2002; SANCHEZ; SOARES, 2006; CASTAÑO, 2011; ABELES, ROSSOL, 2012). Os monócitos intermediários produzem IL-1 $\beta$ , IL-6 e L-8 (CROS, 2010; ZAWADA, WONG, 2011) e são considerados potentes indutores de inflamação, assim como os não clássicos, por produzirem alto níveis de TNF e baixos níveis de IL-10 (CROS, 2010; ZAWADA, AQUILAR-RUIZ, WONG, 2011).

Os monócitos não clássicos, considerados os mais maduros entre as subpopulações, por possuírem maior expressão de CD16, representam 5 a 10% do número total de monócitos circulantes. Wong e colaboradores 2011 e Zawada 2011 e colaboradores demonstram que estes monócitos expressam genes relacionados à mobilidade do citoesqueleto (ZAWADA, WONG, 2011). Além disso, Cros e colaboradores 2010 demonstraram, *in vivo*, que esta subpopulação possui uma maior motilidade em relação as subpopulações não clássicas e intermediárias, desta forma sendo considerados “monócitos patrulheiros”. Apesar de serem considerados indutores de proliferação e ativação de células T (ZAWADA, 2011), possuem baixa expressão de genes relacionados ao MHC classe II e capacidade fagocítica reduzida (CROS, 2010). Monócitos não clássicos são os maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias, como IL- 1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando comparados com as demais subpopulações (BELGE, 2002; WONG, 2011) e produzem quimiocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de células para o local da inflamação (ZAWADA, 2008; ZIEGLER-HEITBROCK, 2010).

Em várias doenças inflamatórias e infecções bacterianas e virais, já foi evidenciado a expansão das subpopulações de monócitos CD14<sup>+</sup> expressando CD16 e que parece estar associada ao processo inflamatório e a maior gravidade da doença (HAN et al., 2009; PASSOS et al., 2015; POEHLMANN et al., 2009; SKINNER et al., 2005; SOARES et al., 2006).

### 1.5.1 Subpopulações de monócitos na TB

Os macrófagos desempenham papel crucial na resposta imunológica do hospedeiro contra o Mtb por serem umas das primeiras células a entrarem em contato com o bacilo após a inalação. Essa resposta inicial associada a fatores externos, por um motivo ainda não compreendido, determinará se o indivíduo irá eliminar o bacilo, estabelecer o estado de latência ou desenvolver a TB primária. Tendo em vista que os monócitos possuem subpopulações com diferentes fenótipos e funções, compreender de que forma essas subpopulações estão relacionadas na resposta imune contra o Mtb fornecerá conhecimentos para uma melhor compreensão da patogênese da doença.

Castaño e colaboradores (2011) demonstraram *in vitro* que há um aumento das subpopulações de monócitos em indivíduos com TB e que essa expansão estaria relacionada com a expansão das subpopulações de monócitos CD16<sup>+</sup> (CASTAÑO, 2011) e a altos níveis de IL-10 secretados por monócitos de pacientes com TB. Calzada-Wack e colaboradores (1996) demonstraram *in vitro* que monócitos CD16<sup>-</sup> frente a IL-10 passaram a expressar a molécula CD16 mudando seu fenótipo (CALZADA-WACK, 1996). Balboa e colaboradores também observaram um aumento de monócitos CD16<sup>+</sup> na corrente sanguínea, porém quando estimulados com derivados do Mtb, observou-se uma expansão de monócitos CD16<sup>-</sup> (BALBOA et al., 2015).

A caracterização das subpopulações de monócitos *ex-vivo* e após estímulo fornecerá uma melhor compreensão do papel que os monócitos desempenham na TB. Portanto, a avaliação das subpopulações de monócitos na TBL e TB ativa é importante, pois o possível desequilíbrio entre as subpopulações de monócitos circulantes pode estar envolvido na imunopatogênese da TB. Além disso, em uma perspectiva futura, essa linha de estudo possibilita a identificação de biomarcadores, tendo em vista que as subpopulações de monócitos podem apresentar relação com o processo inflamatório e à gravidade da doença.

A hipótese deste trabalho é que as subpopulações de monócitos CD16<sup>+</sup> estão aumentados em indivíduos infectados por Mtb quando comparados com indivíduos saudáveis, assim como os monócitos CD16<sup>-</sup> estão aumentados em pacientes com TB ativa comparados com indivíduos com a forma latente da TB.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar as subpopulações de monócitos em pacientes com a forma ativa e latente da tuberculose pulmonar.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência das subpopulações de monócitos baseados nos marcadores de superfície celular CD14<sup>+</sup> e CD16<sup>+</sup>;
- Determinar os níveis intracelulares de TNF e IL-10 produzidas pelas diferentes subpopulações de monócitos;
- Avaliar a ativação celular através dos marcadores CD40 e MHC II das subpopulações de monócitos em pacientes com a forma ativa e latente da tuberculose pulmonar.

### 3 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação compõem o artigo científico intitulado Avaliação das subpopulações de monócitos em pacientes com tuberculose pulmonar “**Evaluation of monocyte subsets in tuberculosis pulmonary patients**”. Neste estudo, a frequência e o nível de ativação, bem como as citocinas intracelulares produzidas pelas diferentes subpopulações de monócitos, foram avaliadas em pacientes com tuberculose pulmonar a fim de caracterizar melhor o papel dessas subpopulações na imunopatogênese da tuberculose.

## EVALUATION OF MONOCYTE SUBSETS IN TUBERCULOSIS PULMONARY PATIENTS

**Jéssica Petrilli<sup>a</sup>**, Iukary Takenami<sup>a</sup>, Lucas Pedreira de Carvalho.<sup>a,b</sup>, Lee W. Riley<sup>c</sup>, Sérgio Arruda<sup>a,d/+</sup>

<sup>a</sup>Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil; <sup>b</sup>Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Salvador, Bahia, Brazil <sup>c</sup>School of Public Health, University of California, Berkeley, California, USA; <sup>d</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>+</sup>Correspondence to: Jéssica Petrilli. Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil 40296710. Tel: (+55) 71 3176 2232. e-mail: [jessica\\_petrilli@hotmail.com](mailto:jessica_petrilli@hotmail.com)

## Summary

Macrophages are important components of the innate immune response against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and may play an important role in the pathogenesis of tuberculosis (TB). Macrophages are derived from monocytes, which are classified into subpopulations from the expression of CD14 and CD16 surface molecule. They are denominated classics, intermediate and non-classical, and have functional and phenotypic differences. The factors that lead to the development of active tuberculosis are not clear yet. However, an imbalance between subpopulations of monocytes may be involved in the immunopathogenesis of TB, since macrophages are important cells in the initial immune responses of the disease. In this study we evaluated the monocyte subsets in patients with active and latent TB (ILTB). Volunteers with active TB, ILTB and healthy subjects were recruited to evaluate the frequency, levels of activation and cytokine production of blood monocytes subsets circulating and after the antigenic stimulation by flow cytometry. Our results did not show significant differences in the frequency, activation levels and cytokine production of monocytes subsets between studies groups. However, patients with active TB have an increased of frequency and activated levels of classical monocytes after antigenic stimulation compared to healthy controls. An expansion of CD16<sup>+</sup> in monocytes subsets of TB patient was not observed. Moreover, it was observed an expansion and increased activation of CD16<sup>-</sup> monocytes after antigenic stimulation in individuals TB and LTB. Thus, the classical monocytes seems to play a role in TB infection, since this subpopulation expands and appears more active primarily after antigenic stimulation in response to Mce1A. However, this expansion of classical monocytes in TB still needs to be evaluated.

**Keywords:** Monocytes subsets, active tuberculosis, latente tuberculosis infection

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is a chronic disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that affects the world population over centuries. According with the world health organization (WHO), 1/3 of the world's population is infected by TB bacilli (1). The Mtb infect alveolar macrophage causing chronic granulomatous inflammation in lung tissue. After inhalation, the individual can eliminate the bacillus, developing active TB or can establish a state of latency known as latent tuberculosis infection (LTBI) (2). Although there are several studies that help better understanding the disease, the mechanisms leading to the control or the persistence of bacilli in granulomatous tissue are still unknown (3–6).

In fact, the host immune response can play an important role for the development of TB. The control of the infection and establishing of LTBI depend on the efficiency of the host immune response against bacilli. The immune response is mainly mediated by CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes that differentiate into type 1 T helper (Th1). The CD4<sup>+</sup> T-cells will activate infected macrophages and induce the production of reactive nitrogen and oxygen, through the release of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), this cell interaction is crucial in the initial control of the disease (7). Thus, macrophages are an important component of innate immune response against the Mtb.

Macrophages are derived from circulating monocytes that arrived to inflammatory site by chemical stimuli through chemotaxis (8). Monocytes are classified based on the expression cell surface of CD14 and CD16 in three distinct subsets: classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (9). Several studies have showed that monocyte subsets have functional and phenotypic differences (10–12). In addition, many inflammatory diseases caused by bacterial and viral infection have showed that the expansion of CD14<sup>+</sup> monocytes subpopulations expressing CD16<sup>+</sup> could be associated with the inflammation and the severity of this sickness (13–16). Sanchez et al showed an increased frequency of monocytes (CD14<sup>+</sup>) in TB patients (17) and Balboa et al showed that TB patients have an increase frequency of monocytes CD16<sup>+</sup> circulating (18). Castano et al revealed that subsets of CD16<sup>+</sup> monocytes are increased in patients with pulmonary TB compared to individuals with LTBI and healthy controls (2). However, there is no study evaluating the expansion of CD16<sup>+</sup> monocyte subsets (intermediate and non-classical) in TB.

Taken together, these findings suggest that circulating monocyte subsets may have relationship with the inflammatory response and severity of the TB could be involved in immunopathogenesis. In addition, the determination of monocytes profile in TB patients could



be helpful in identification of biomarkers to differentiate active TB from LTBI. Thus, this study evaluates the peripheral blood monocyte subsets in TB patients and LTBI individuals.

## **2. Material and methods**

### ***2.1. Study participants***

Nine untreated patients with pulmonary TB (TB group) were recruited at the Instituto Brasileiro de Investigação da Tuberculose (IBIT). The diagnosis of TB was confirmed by sputum smear using Ziehl-Neelsen staining. Six volunteers, who tested positive for tuberculosis skin test (TST; Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), with a positive reaction  $\geq 5$  mm, were recruited to LTBI group and pulmonary TB was excluded by medical evaluation. Whereas, participants who had results of TST negative, with a reaction  $< 5$  mm and/or negative results of Interferon Gamma Release Assay (IGRA) were classified as healthy control group (HC) ( $\text{IFN-}\gamma < 0.35$  IU/mL). The TST and QFT-IT test were performed according to the manufacturer's recommendations. The data demographics and characteristics of all study groups are showed in Table 1. Informed consent was obtained of all participants and the Human Subjects Committees of the Oswaldo Cruz Foundation in Salvador, Brazil approved this research.

### ***2.2. Isolation of peripheral blood mononuclear cells***

Peripheral blood of mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll-Hypaque (histopaque®-1077-Sigma Aldrich) gradient density centrifugation from 10 mL of venous blood collected in sodic heparinized tubes from TB, LTBI and HC groups. PBMCs were aspirated and washed three times with saline 0.9%. Then, the cells were resuspended in 1mL of RPMI-1640 with L-glutamine and sodium bicarbonate (Roswell Park Memorial Institutes (RPMI) – 1640-Sigma Aldrich) then supplemented with SBF 10% (Invitrogen), gentamicin and streptomycin. The PBMC were counted in a Neubauer chamber with trypan blue (Sigma-Aldrich) then were separated for phenotyping analysis *ex vivo* and after *in vitro* cell culture.

### ***2.3. Phenotyping monocytes and expression of co-stimulatory molecules***

One million of PBMCs per milliliter ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were analyzed for phenotyping of circulating monocytes from TB, LTBI and HC groups by flow cytometry in a Fluorescence-activated cell sorting (FACS) tube (BD Biosciences). Before stained, cells were incubation with SBF 10% for 10 minutes at room for blocking non-specific binding. Thus, they were stained

with antibodies monoclonal anti-human CD14-APC (clone M5E2), CD16-PE (clone 3G8), CD40-FITC (clone 5C3) and HLA-DR-PE-CY7 (clone G46-6) or isotypes control antibodies for determination of monocyte subsets and expression of co-stimulatory molecules during 30 minutes at room temperature. After that, it was fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (VetecQuimica). The cells were stored at 4°C until acquisition of flow cytometry.

#### **2.4. Stimulation of monocyte**

One million of PBMCs per milliliter were cultured in FACS tubes in the presence or absence of antigenic stimulus for 6 hours at room temperature and 5% of CO<sub>2</sub>. The cells were cultured in the presence of 10 µg/mL of total antigen derived of attenuated strain of Mtb (H37Ra) – Sigma Aldrich, 10 ng/mL of *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (LPS) – Sigma Aldrich and 5 µg/mL of recombinant mammalian cell entry protein 1A (Mce1A), donated from the University of California, Berkeley. After the time of culture, supernatants were discarded and the cells were centrifuged for 7 minutes at room temperature and 1300 rpm. After that, the cells were stained with antibodies monoclonal anti-human CD14-APC (clone M5E2 - BD Biosciences), CD16-PE (clone 3G8 - BD Biosciences), CD40-FITC (clone 5C3 - BD Biosciences) and HLA-DR-PE-CY7 (clone G46-6 - BD Biosciences) or isotypes control antibodies for determination of monocyte subsets and expression of co-stimulatory molecules during 30 minutes at room temperature. In addition, the cells were intracellular stained for measurements of cytokines with antibodies monoclonal anti-human TNF-α-PE-CY7 (clone MAB-11 - BD Biosciences), IL-10-PE-CF594 (clone JES3-19F1 - BD Biosciences) or isotypes controls according to manufacturer's protocol, using the protein transport inhibitor (Golgi-stop™ - Sigma Aldrich) to prevent cytokine secretion. The cells were fixed with 4% PFA (VetecQuimica) and stored 4°C until acquisition of flow cytometry.

#### **2.5. Flow cytometry**

The monocyte subsets were determined based on size, cell granularity, expression of HLA-DR class II and then subdivided into classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>DR<sup>+</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>DR<sup>+</sup>) monocytes (Figure 1A). Cells were acquired in a BD LSRFortessa<sup>®</sup> with 50,000 events. The frequency of stained cells and the mean fluorescence intensity (MFI) were estimated using the FlowJo 7.6.1 software (Tree Star, Inc, Ashland, OR.)

## **2.6. Statistical analysis and data representation**

Once the frequency of the monocyte subsets assumed normal distribution, One Way Analysis of Variance (ANOVA) with post-ANOVA pairwise comparisons followed tukey post test were used to assess differences among frequencies of the monocytes subsets circulating with normal distribution. Kruskal-Wallis test followed Dunn's post test were used to assess differences between the three groups with non-normal distribution. To evaluating differences of monocyte subsets frequencies before and after culture, ANOVA with Friedman's test followed Dunns's test were used. Samples with normal distribution were showed by mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD), median and range [median (minimum – maximum)] were showed in samples with non-normal distribution. Graphpad Prism v.5.0 (San Diego, CA) was used to statistical analyses and was considered significant difference  $p \leq 0.05$ .

## **3. Results**

### **3.1 Frequency of monocyte subsets circulating and expression of cell surface co-stimulatory molecules**

The frequencies of monocyte subsets circulating from TB, LTBI and HC groups were summarized in Table 2. No significant difference was observed among study groups ( $p > 0.05$ ) (Figure 1D). However, TB group has a slight increase frequency of non-classical monocytes compared to LTBI group ( $p = 0.06$ ).

To evaluating the level of activation in monocyte subsets from TB and LTBI group, the expression of HLA-II and CD40 was determined (Table 2). Comparing the expression of HLA-II among the groups, TB patients had a higher increased of HLA-II of non-classical monocytes compared to HC group ( $p = 0.04$ ). No differences were observed in expression of CD40 of monocyte subsets among the groups of study ( $p > 0.05$ ). However, were observed differences in expression of these molecules among the monocyte subsets of TB and LTBI group. In pulmonary TB, intermediate monocytes had a higher MFI of HLA-II compared to classical monocytes ( $p = 0.01$ ) and an increase in the frequency of CD40 ( $p = 0.001$ ) and MFI of this molecule in intermediate monocytes compared to non-classical monocytes ( $p = 0.003$ ). LTBI group showed an increase in expression of HLA-DR of intermediate monocytes compared to classical and non-classical monocytes ( $p = 0.001$ ). No difference was observed in expression of CD40 among the subsets in LTBI group.

### 3.1. Frequency of monocyte subsets after antigenic stimulation

Monocyte subsets of TB, LTBI and HC group were cultivated in the presence or absence of antigens to observe changes in the frequency induced by antigenic stimulation. Differences among the groups of monocyte subsets frequencies were observed (Figure 2). Intermediate monocytes of HC group in response to H37Ra showed increased frequency compared to TB group ( $p=0.04$ ). No significant differences were observed in monocyte subsets of study groups in response to others antigens ( $p>0.05$ ). However, an increased frequency of classical monocytes ( $p=0.03$ ) and a decreased frequency of intermediate ( $p=0.02$ ) and non-classical monocytes in absence of antigens stimulation ( $p=0.05$ ) were found in TB patients compared to HC group. This decrease of non-classical monocytes was observed between HC and LTBI group ( $p=0.02$ ).

Comparing the monocyte subsets in each group differences were observed in response to antigens. Subjects with active TB had an increased frequency of classical monocytes ( $p=0.04$ ) and a decrease frequency of non-classical monocytes in response to LPS compared to culture medium without antigens ( $p=0.02$ ). No difference of intermediate and non-classical monocytes frequency, after stimulation, was observed. In LTBI group, increase of classical monocytes in response to Mce1A ( $p=0.03$ ) and LPS ( $p=0.05$ ) was observed compared to culture medium without antigen. It was observed a trend in decreasing the frequency of intermediate monocytes in response to Mce1A compared to the culture without antigens ( $p=0.06$ ).

Interestingly, comparing the frequency of circulating monocyte subsets and after stimulation (Figure 2), an increased frequency of classical monocytes in response to all antigens were observed in TB group ( $p<0.05$ ). Although the intermediate monocytes showed no significant differences in response to all antigens, it can be observed a slight decrease of this subset compared to *ex vivo*, in TB group, especially in response to LPS. Equally, the non-classical monocytes showed a decreased in response to LPS and H37Ra compared to non-classical monocytes circulating in patients with active TB. In LTBI subjects, the classical monocytes showed increased frequency in response to Mce1A compared to classical monocytes *ex vivo* ( $p=0.03$ ). In contrast, although it have not shown significant difference, an increase of intermediate monocytes frequency can be observed compared to the same subset *ex vivo* ( $p=0.06$ ).

### 3.2. Expression of cell surface co-stimulatory molecules after *in vitro* stimulation

Upon antigenic stimulation, TB patients showed an increased MFI of HLA-DR of classical monocytes in response to Mce1A ( $p=0.02$ ), H37Ra ( $p=0.05$ ) and LPS ( $p=0.001$ )

compared to classical monocytes in HC group (Figure 3). In addition, expression of HLA-DR was increased in intermediate monocytes in response to Mce1A ( $p=0.02$ ) in TB patients compared to HC group. The higher expression MFI of HLA-DR of intermediate monocytes between TB and HC groups, were also observed in culture without antigen ( $p=0.02$ ). No significant differences of MFI of HLA-DR in intermediate monocytes were observed between TB and LTBI groups after stimulation. Curiously, observing variances before and after culture with antigens, intermediate monocytes displayed an increased MFI of HLA-DR in response to H37Ra compared to intermediate monocytes circulating in LTBI group ( $p=0.03$ ).

The level of activation of monocyte subsets were also evaluated by expression of CD40. HC group had an increase frequency and MFI of CD40 in response to Mce1A compared to TB group. Moreover, TB patients had an increased in frequency of classical monocyte expressing CD40 in response to Mce1A compared to culture without antigens.

### **3.4 Cytokines production by monocyte subsets**

Intracellular levels of TNF and IL-10 were evaluated in monocyte subsets of active TB, LTBI and HC groups after 6h of antigenic stimulation. All studies groups showed increased TNF production in monocyte subsets. In response to all antigens, intermediate monocytes had higher frequency and MFI of TNF compared to non-classical monocytes in TB and LTBI groups ( $p<0.01$  and  $p<0.01$ , respectively). HC group did not show difference of TNF expression among the monocyte subsets (data not shown).

In TB group, the frequency of TNF-producing intermediate monocytes was similar in culture without stimulus compared to other two monocyte subsets. However, the frequency of TNF-producing intermediate monocytes were higher in response to Mce1A [99.6 (88.9-100);  $p=0.05$ ], H37Ra [97.4 (80.3-100);  $p=0.01$ ] and LPS [98.5 (73-100);  $p=0.01$ ] compared to non-classical subsets. Besides that, MFI of TNF in intermediate monocytes also were higher than in non-classical subsets in response to Mce1A [1,467 (64.9-9,910);  $p=0.01$ ], H37Ra [284 (23. 9-9,910);  $p=0.02$ ] and LPS [824 (97.7-3,307);  $p=0.05$ ].

The same occurred with LTBI group in response to Mce1A [100 (88.9-100);  $p=0.01$ ], H37Ra [100 (58.1-100);  $p=0.01$ ] and LPS [100 (73-100);  $p=0.05$ ]. There was no difference in frequency TNF-producing monocyte subset among three groups of study. However, between active TB and HC groups, the intermediate monocytes had a slight increase compared to non-classical monocytes in response to Mce1A. The levels of IL-10 produced by monocyte subsets could not be detected by flow cytometry.

#### 4. Discussion

In the analysis of circulating monocytes, our findings demonstrated that there were no difference in frequencies of monocyte subsets circulating among TB, LTBI and HC groups. However, TB patients had a slight low frequency of classical monocytes circulating compared to HC and LTBI groups and slight increase of non-classical monocytes circulating compared to LTBI group. Although the differences were not statistically significant, these results are consistent with the studies which characterizes the monocyte subsets circulating in TB (2, 19).

Sanchez et al demonstrated a higher frequency of monocytes (CD14<sup>+</sup>) in pulmonary TB and other extra pulmonary forms of TB (17). Balboa et al showed that TB patients have an increase frequency of monocytes CD16<sup>+</sup> and wich subsets have a different function while Barcelos et al did not find expansion of monocytes CD16<sup>+</sup> in TB patients (18–20). On the other hand, Castaño et al showed that intermediate and non-classical monocytes are the responsible for this expansion (2). Nevertheless, they did not evaluated the co-expression CD14 and CD16 of monocytes subsets in TB after stimulus, that are important for understanding the expansion of CD16<sup>+</sup> subsets described in TB patients. .

According to Barcelos et al, there are no differences of monocytes CD16<sup>+</sup> circulating frequency between TB patients and HC subjects. Nevertheless, Castano et al showed that TB patients have an increase frequency of non-classical and intermediate monocytes circulating and, in addition, Balboa et al showed that monocytes CD16<sup>+</sup> are increase and the monocyte subsets have different function (19). Our findings did not find expansion of intermediate monocytes among the groups that was evident in the Castano et al study, only a trivial increase of non-classical monocytes were observed. With a larger sample size, this result may be evidenced. The increase of non-classical monocytes in TB could be due to relation of these cells with patrolling functions in the immune response (11), once infected with Mtb, cells are recruited to site of infection in an attempt to contain the growth the bacillus. Beyond that, non-classical monocytes has been shown to play a key role to control of bacterial infection in sepsis (21). The functions of this monocyte subset is not clear in TB but these expansion can be observed in co-infection with HIV (22).

In addition, we also evaluated the activation levels of monocyte subsets circulating. Trying to understand weather this cells could have a relation with susceptibility to developing TB, we compared the expression levels of these marks and we showed that non-classical monocytes in TB patients had a higher expression of HLA-II compared to HC group. This finding demonstrate that non-classical monocytes have role in TB infection, because their

frequency seems to be increased as stated earlier. Besides, according to the results, the non-classical monocytes have greater HLA-II expression as compared to healthy individuals, demonstrating an important role of this subgroup in the transition from innate to acquired immune response. Although the non-classical monocytes are not the most active cells in TB patients, when compared with healthy individuals it showed to be more activated. However, no differences were observed in an expression of CD40 that is an important co-stimulatory molecule for Cells presenting antigens (APCs) activations.

Looking inside of TB group, although the classical monocytes subsets are the most frequent subset circulating, our finds showed that the intermediate monocytes are the most activated subset for presenting an increased expression of CD40 and HLA-DR. Our finding are in agreement with studies of molecular biology that evidenced the higher expression levels of these markers genes of intermediate monocytes (10, 23). According to this, intermediate monocytes can display an important role in the pro-inflammatory response in TB patients since it seems more activated and expressing genes involved in antigen uptake, processing and presentation.

According to some studies in TB, TB patients have an expansion of CD16<sup>+</sup> monocyte subsets circulating (2, 19). Therefore, the frequency of monocyte subsets after response to all antigens appears to be similar among all study groups. However, TB patients in response to LPS had an increased frequency of classical monocytes while have a decrease of non-classical frequency. LTBI group also had an increased frequency of classical in response to LPS and Mce1a. Although TB patients had a decreased of non-classical monocytes, this subset had high expression of HLA-DR compared to HC group in response to LPS. These results indicate that the expansion of CD16<sup>+</sup> although slight, can be expressive in TB. The frequencies of classical monocytes increased after antigenic stimulation and we observed an increase of its activation level. According to Zawada et al, MHC class II can up regulate classical monocytes, thus this subset activated can induce T cell proliferation (17). Balboa et al also observed an expansion of the CD16<sup>-</sup> monocytes in response to different concentrations of Mtb derivatives. Furthermore, they demonstrated that the classical monocytes are more likely to migrate to the site of infection, have higher production capacity reactive oxygen and greater resistance to bacterial intracellular growth Thus, we suggest that the classical monocytes seem to play an important role in TB infection trying to control the infection.

Mce1A is related with entrance and permanence of bacilli within the host cell, but there is no study in the literature evaluating the cellular response to Mce1A (24–27). Curiously, the frequency of classical monocytes had an increased in all studies group in response to Mce1A

compared to monocytes circulating. TB group had an increase of classical monocytes frequency compared to monocytes circulating in response to Mce1A. Besides that, classical monocytes of TB group showed to be more activate in response to Mce1A compared to HC group. Despite the classical monocytes have shown an increase expression of CD40 frequency in response to Mce1A compared to culture without antigens in TB group, the HC group showed an increase expression of frequency and MFI CD40 in classical monocytes in response to Mce1A compared to TB group. The intermediate monocytes also showed more activate in response to Mce1A in TB group compared to HC group. These finds showed that Mce1A affects more the monocytes subsets of TB group than HC group causing expansion and activation of classical monocytes. Mce1a is related to bacilli latent (27, 28) and this results showed the possible role of this protein in TB control.

Interestingly, when we placed monocytes subsets in culture, we noticed slight changes in the frequencies of monocytes compared to monocyte subsets circulating. Although theses finds were not statically significant, classical monocytes increased, as intermediate and non-classical monocytes decreased, even in culture medium without antigens, in all groups of study. For some reason, the monocytes seem to lose the expression of CD16 following incubation. The expression of CD16 in monocytes CD16<sup>-</sup> in presence of IL-10 has been demonstrated *in vitro* (19) and could be an explanation for expansion of CD16<sup>+</sup> subsets found in TB since in this group there is a high IL-10 production by monocytes. Contrarily, our find indicate that in response to antigens there is a decreased of CD16<sup>+</sup> since the non-classical frequency are higher in culture medium without antigens. Zawada et al had been shown that monocytes CD16<sup>+</sup> expressed apoptotic genes and undergo apoptosis after activation (23). However, it is necessary more setting for understanding this behavior of monocytes CD16<sup>+</sup> *in vivo* and *in vitro*.

It is well known the potential production of TNF by CD16<sup>+</sup> subsets, mainly non-classical monocytes (10, 11, 29). However, our results demonstrated a higher expression (frequency and MFI) of TNF in intermediate monocytes than non-classical monocytes, after antigenic stimulation, in TB and LTBI groups. In TB group, the intermediate monocytes were the most producers of TNF. In spite of that, it were possible to identify a biggest production of TNF between the two subsets CD16<sup>+</sup> in TB groups, which has only been shown on monocytes CD16<sup>+</sup> (2, 20, 29). However, we did not observe difference of TNF expression among active TB, LTBI and HC groups. Muris et al showed that the monensin, usually present in the protein transport inhibitors for no releasing of extracellular cytokines, affect the intracellular IL-10 detection (30). Moreover, maybe with more hours of culture it can be observed IL-10 levels. The IL-10 detection would be important for a better understanding of subpopulations of monocytes and



their functions in TB, as it is an anti-inflammatory cytokine and is involved in controlling the disease.

Several studies have been done trying to understand better infection diseases through the monocytes subsets (15, 16, 19, 31, 32). This approach in TB is important since the monocytes/macrophages are the first line of the immune defense against Mtb. In addition, it is still unclear how the transition occurs from the state of latency to disease. Although there are few studies of monocytes in TB the articles have inconsistent results. These inconsistent findings may be due to differences that each author choose to determine the monocyte subsets, since there is not a universally type of demarcation based in a standard cell surface markers.

### **Acknowledgement**

**Funding:** This study was supported by Fundação de amparo a pesquisa da Bahia (FAPESB)

**Conflicts of interest:** The authors have no personal conflicts of interest in this present study.

**Ethical approval:** The informed consent were signed of all participants and were previously approved by Ethics Commitment of Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz/BA, Salvador, Bahia, Brazil.

### **References**

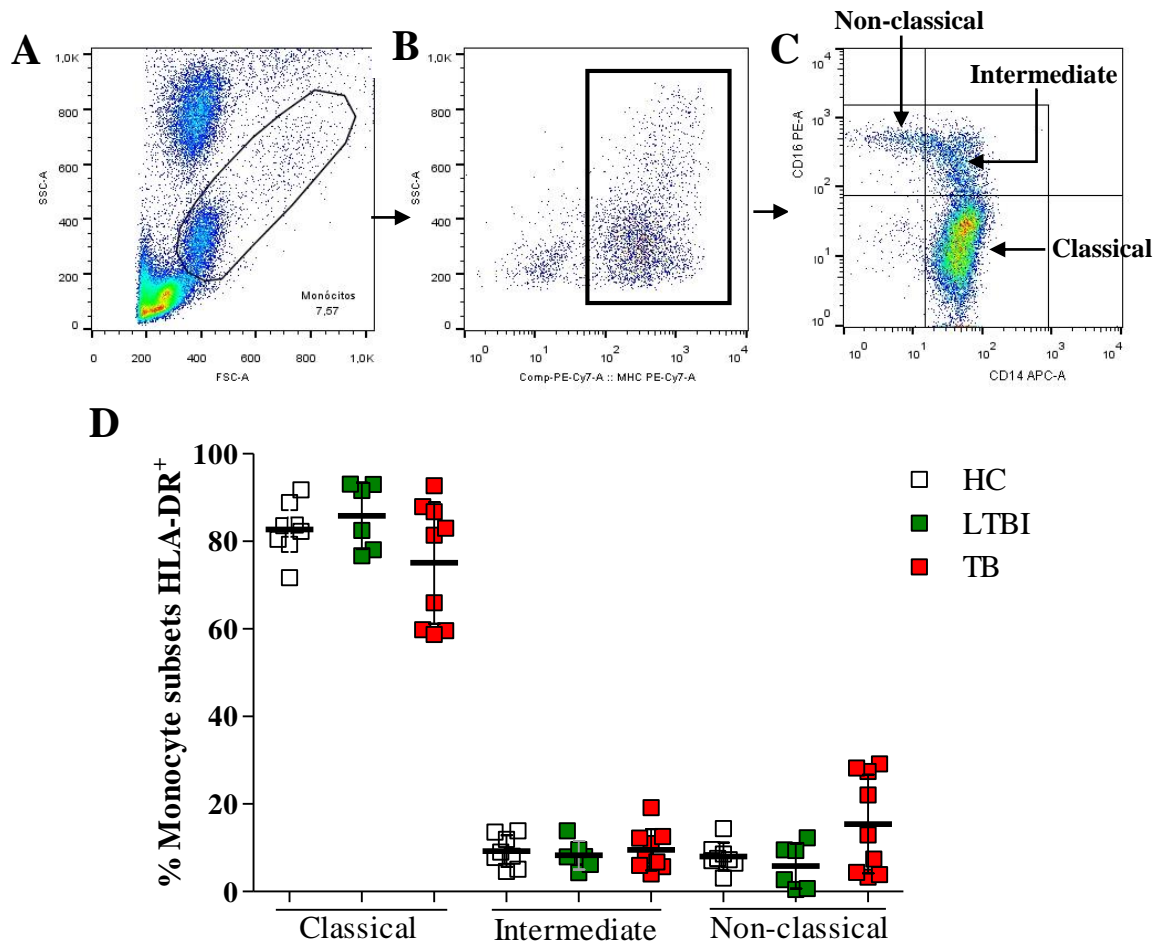
1. WHO | Global tuberculosis report 2014. *WHO* .
2. Castaño, D., L. F. García, and M. Rojas. 2011. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis* 91: 348–360.
3. Tufariello, J. M., J. Chan, and J. L. Flynn. 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect. Dis.* 3: 578–590.
4. Zumla, A., R. Atun, M. Maeurer, P. Mwaba, Z. Ma, J. O'Grady, M. Bates, K. Dheda, M. Hoelscher, and J. Grange. 2011. Viewpoint: Scientific dogmas, paradoxes and mysteries of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 16: 79–83.

5. Flórido, M., A. M. Cooper, and R. Appelberg. 2002. Immunological basis of the development of necrotic lesions following *Mycobacterium avium* infection. *Immunology* 106: 590–601.
6. Schorey, J. S., M. C. Carroll, and E. J. Brown. 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277: 1091–1093.
7. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 463–496.
8. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 669–692.
9. Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral. *Blood* 74: 2527–2534.
10. Wong, K. L., J. J.-Y. Tai, W.-C. Wong, H. Han, X. Sem, W.-H. Yeap, P. Kourilsky, and S.-C. Wong. 2011. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16–e31.
11. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.-P. Jais, D. D’Cruz, J.-L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 33: 375–386.
12. Zhao, C., H. Zhang, W.-C. Wong, X. Sem, H. Han, S.-M. Ong, Y.-C. Tan, W.-H. Yeap, C.-S. Gan, K.-Q. Ng, M. B.-C. Koh, P. Kourilsky, S.-K. Sze, and S.-C. Wong. 2009. Identification of Novel Functional Differences in Monocyte Subsets Using Proteomic and Transcriptomic Methods. *J. Proteome Res.* 8: 4028–4038.
13. Skinner, N. A., C. M. MacIsaac, J. A. Hamilton, and K. Visvanathan. 2005. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 141: 270–278.
14. Soares, G., A. Barral, J. M. Costa, M. Barral-Netto, and J. Van Weyenbergh. 2006. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J. Leukoc. Biol.* 79: 36–39.
15. Passos, S., L. P. Carvalho, R. S. Costa, T. M. Campos, F. O. Novais, A. Magalhães, P. R. L. Machado, D. Beiting, D. Mosser, E. M. Carvalho, and P. Scott. 2015. Intermediate Monocytes Contribute to Pathologic Immune Response in *Leishmania braziliensis* Infections. *J. Infect. Dis.* 211: 274–282.
16. Amorim, C. F., A. S. Souza, A. G. Diniz, N. B. Carvalho, S. B. Santos, and E. M. Carvalho. 2014. Functional Activity of Monocytes and Macrophages in HTLV-1 Infected Subjects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.

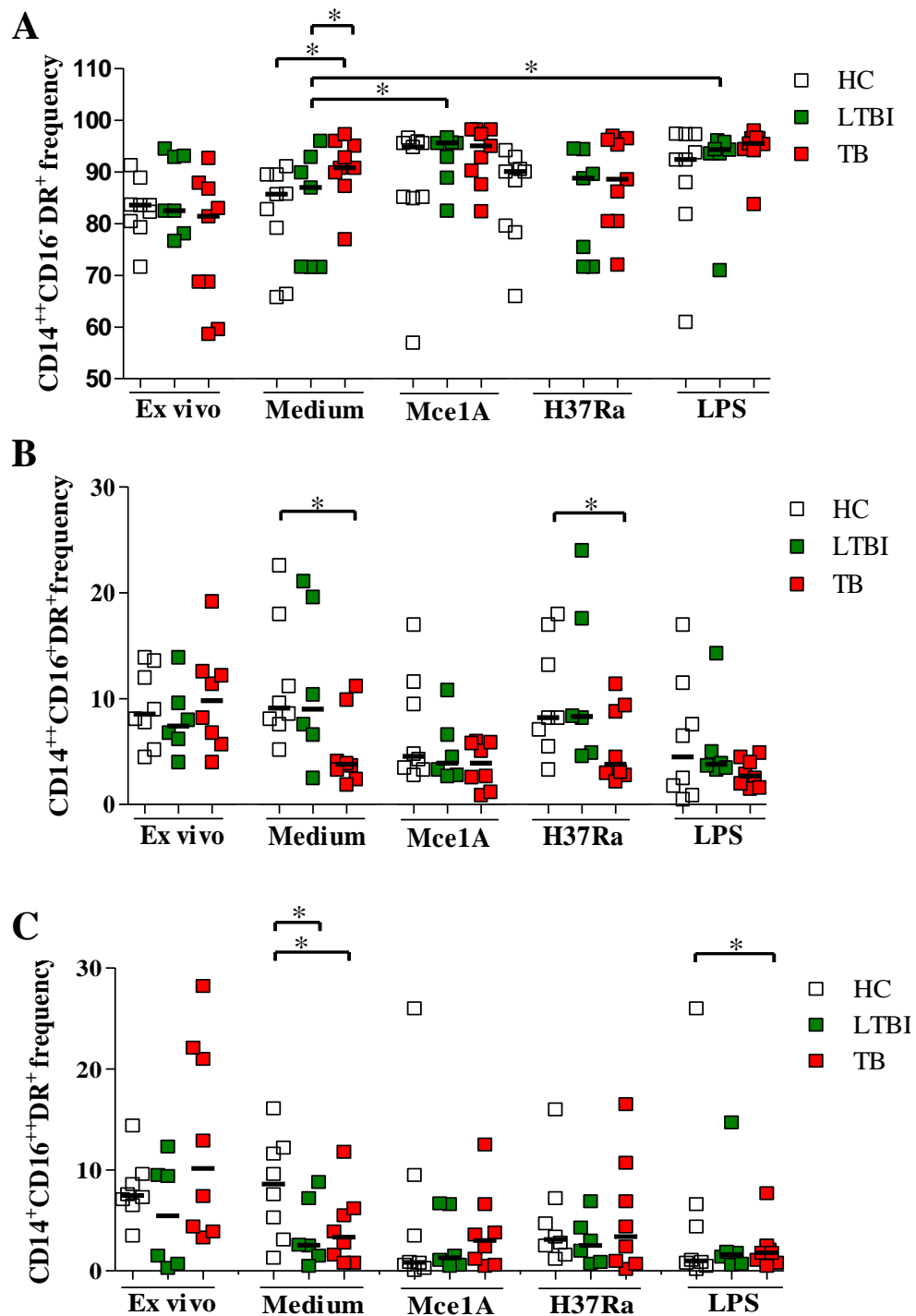
17. Sanchez, M. D., Y. Garcia, C. Montes, S. C. Paris, M. Rojas, L. F. Barrera, M. A. Arias, and L. F. Garcia. 2006. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 8: 2492–2500.
18. Balboa, L., M. M. Romero, E. Laborde, C. A. Sabio Y García, J. I. Basile, P. Schierloh, N. Yokobori, R. M. Musella, J. Castagnino, S. de la Barrera, M. C. Sasiain, and M. Alemán. 2013. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK. *Eur. J. Immunol.* 43: 335–347.
19. Balboa, L., J. Barrios-Payan, E. González-Domínguez, C. Lastrucci, G. Lugo-Villarino, D. Mata-Espinoza, P. Schierloh, D. Kviatcovsky, O. Neyrolles, I. Maridonneau-Parini, C. Sánchez-Torres, M. del C. Sasiain, and R. Hernández-Pando. 2015. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clin. Sci.* 129: 319–330.
20. Barcelos, W., O. A. Martins-Filho, T. M. P. D. Guimarães, M. H. P. Oliveira, S. Spíndola-de-Miranda, B. N. Carvalho, and V. de P. C. P. de Toledo. 2006. Peripheral Blood Mononuclear Cells Immunophenotyping in Pulmonary Tuberculosis Patients before and after Treatment. *Microbiol. Immunol.* 50: 597–605.
21. Skrzeczyńska, J., K. Kobylarz, Z. Hartwich, M. Zembala, and J. Pryjma. 2002. CD14+CD16+ Monocytes in the Course of Sepsis in Neonates and Small Children: Monitoring and Functional Studies. *Scand. J. Immunol.* 55: 629–638.
22. VANHAM, G., K. EDMONDS, L. QING, D. HOM, Z. TOOSI, B. JONES, C. L. DALEY, R. HUEBNER, L. KESTENS, P. GIGASE, and J. J. ELLNER. 1996. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 103: 30–34.
23. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–e61.
24. Arruda, S., G. Bomfim, R. Knights, T. Huima-Byron, and L. W. Riley. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261: 1454–1457.
25. Flesselles, B., N. N. Anand, J. Remani, S. M. Loosmore, and M. H. Klein. 1999. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 237–242.

26. Chitale, S., S. Ehrh, I. Kawamura, T. Fujimura, N. Shimono, N. Anand, S. Lu, L. Cohen-Gould, and L. W. Riley. 2001. Recombinant Mycobacterium tuberculosis protein associated with mammalian cell entry. *Cell. Microbiol.* 3: 247–254.
27. Haile, Y., G. Bjune, and H. G. Wiker. 2002. Expression of the mceA, esat-6 and hspX genes in Mycobacterium tuberculosis and their responses to aerobic conditions and to restricted oxygen supply. *Microbiol. Read. Engl.* 148: 3881–3886.
28. Shimono, N., L. Morici, N. Casali, S. Cantrell, B. Sidders, S. Ehrh, and L. W. Riley. 2003. Hypervirulent mutant of Mycobacterium tuberculosis resulting from disruption of the mce1 operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 15918–15923.
29. Belge, K.-U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. The proinflammatory CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168: 3536–3542.
30. Muris, A.-H., J. Damoiseaux, J. Smolders, J. W. Cohen Tervaert, R. Hupperts, and M. Thewissen. 2012. Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: The use of protein transport inhibitors revisited. *J. Immunol. Methods* 381: 59–65.
31. Han, J., B. Wang, N. Han, Y. Zhao, C. Song, X. Feng, Y. Mao, F. Zhang, H. Zhao, and H. Zeng. 2009. CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 52: 553–559.
32. Poehlmann, H., J. C. Schefold, H. Zuckermann-Becker, H.-D. Volk, and C. Meisel. 2009. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* 13: R119.

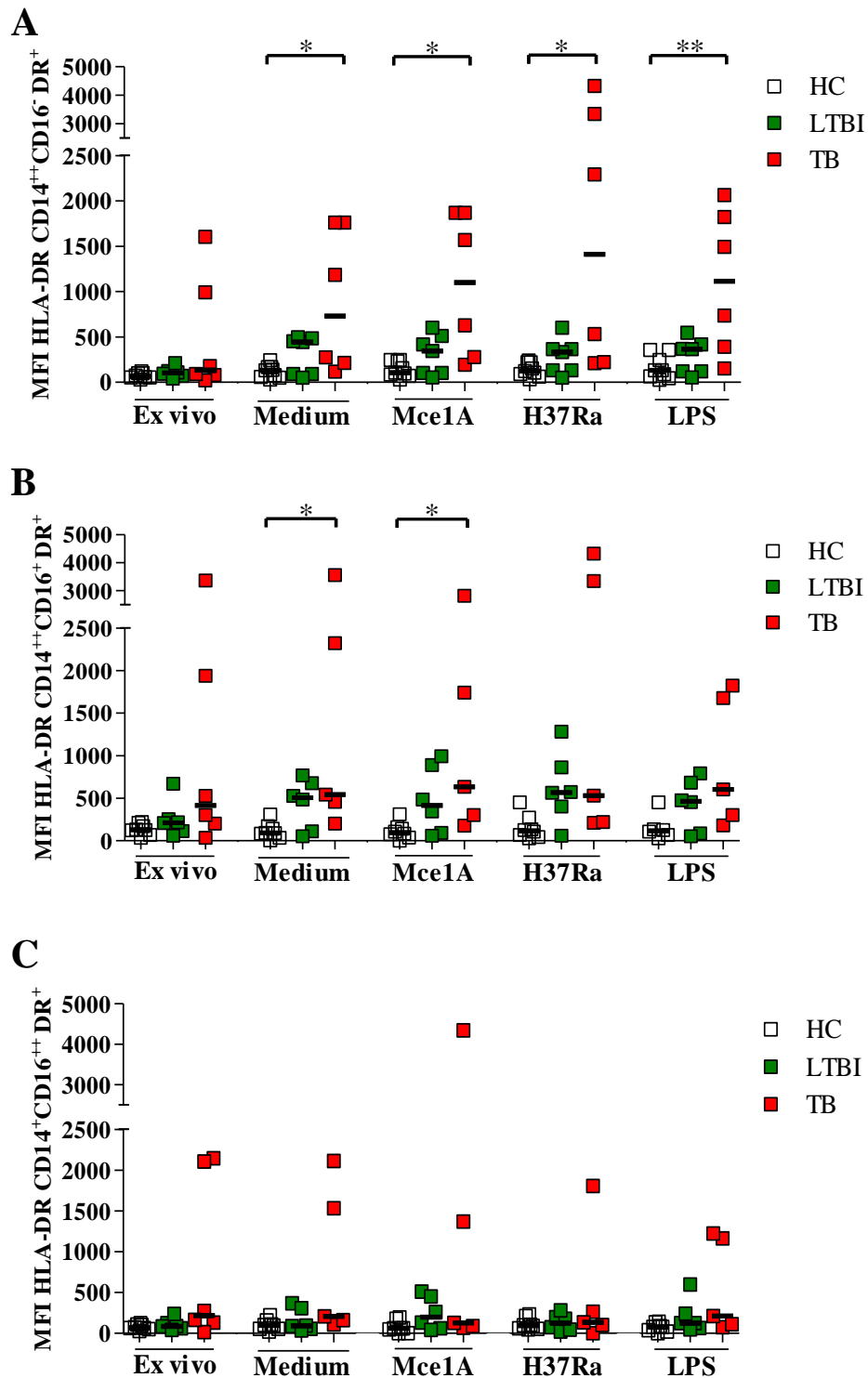
## Figures



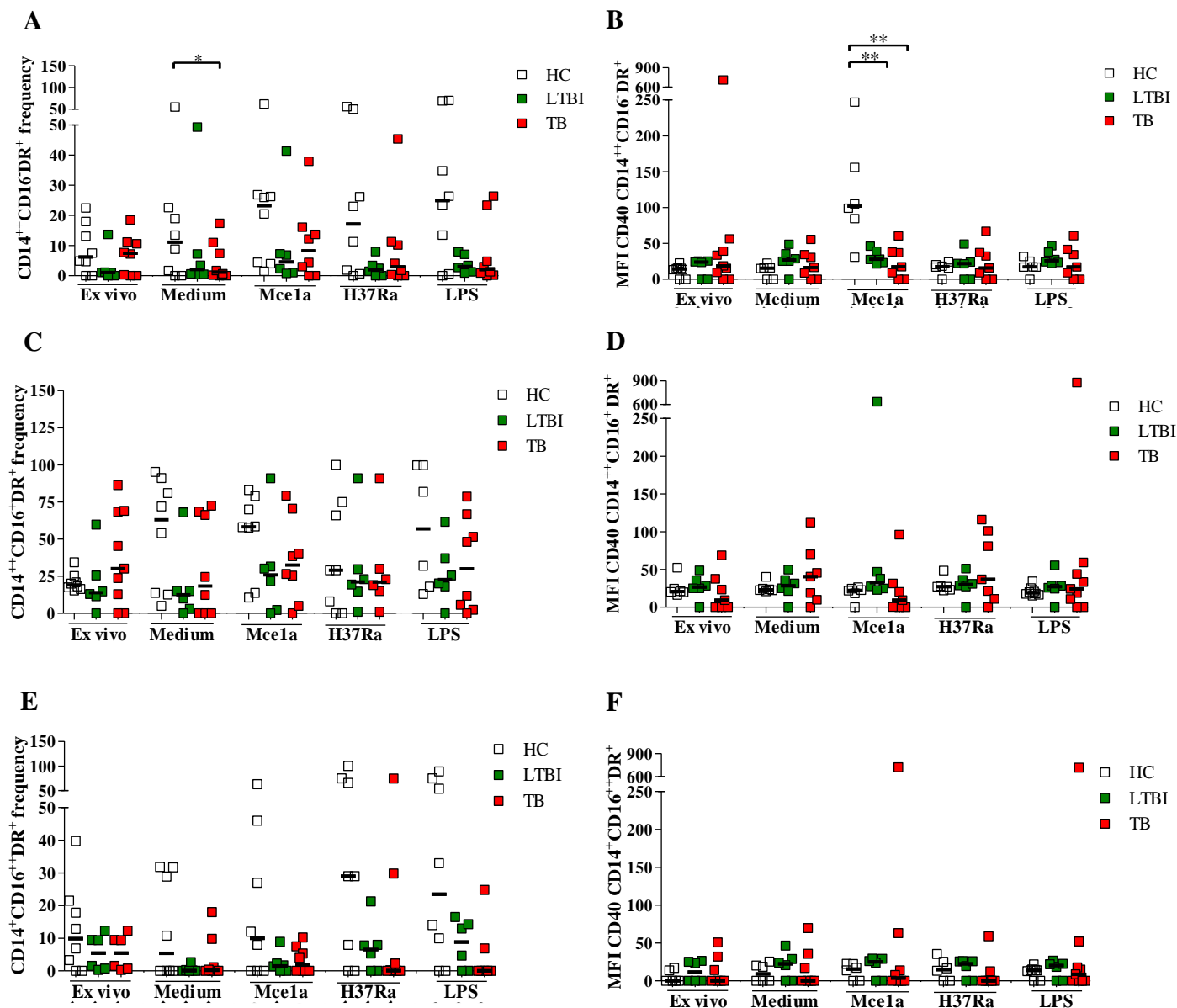
**Figure 1.** Frequencies of monocytes subsets circulating. Monocytes subsets were determined from active TB patients (TB, n=9), subjects with latent tuberculosis infection (LTBI, n=6) and health controls (HC, n=6). A and B. Cytometry analysis was done according to the size and granularity and then the region of HLA-DR class II positive according to isotype control. C. The monocytes were subdivided into classical ( $CD14^{\text{high}} CD16^{\text{neg}} HLA-DR^+$ ), intermediate ( $CD14^{\text{high}} CD16^{\text{high}} HLA-DR^+$ ) and non-classical ( $CD14^{\text{low}} CD16^{\text{high}} HLA-DR^+$ ).



**Figure 2.** Frequencies of monocytes subsets after antigenic stimulation. Monocytes subsets were determined from active TB patients (TB, n=8), subjects with latent tuberculosis infection (LTBI, n=6) and health controls (HC, n=8). A Frequency of classical monocytes. B Frequency of intermediate monocytes and C. Frequency of non-classical monocytes. Data of the monocytes subsets frequency is represented by median. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test were used for statistical analyses (\*p<0.05).



**Figure 3.** Expression of HLA-DR of monocytes subsets after antigenic stimulation. Monocytes subsets were determined from active TB patients (TB, n=5), subjects with latent tuberculosis infection (LTBI, n=6) and health controls (HC, n=8). A MFI of classical monocytes. B MFI of intermediate monocytes and C. MFI of non-classical monocytes. Data of the monocytes subsets frequency is represented by median. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test were used for statistical analyses (\*p<0.05).



**Figure 4.** Expression of CD40 of monocytes subsets after antigenic stimulation by frequency and MFI. Monocytes subsets were determined from active TB patients (TB, n=8), subjects with latent tuberculosis infection (LTBI, n=6) and health controls (HC, n=8). A Classical monocyte frequency and B MFI of classical monocytes; C Intermediate monocyte frequency and D MFI of intermediate monocytes; E Non-classical monocyte frequency and F MFI of non-classical monocytes. Data of the monocytes subsets frequency and MFI are represented by median. Kruskal-Wallis followed by Dunn's post test were used for statistical analyses (\* $p < 0.05$ / \*\* $p < 0.01$ ).



## Tables

**Table 1.** Characteristics of the study groups.

<b>Characteristics</b>	<b>Active TB (n=9)</b>	<b>LTBI (n=6)</b>	<b>HC (n=8)</b>
Gender, n (%)			
Male	6 (54.5)	2 (33)	5 (62.5)
Female	5 (45.5)	4 (66.7)	3 (3.5)
Mean age, years (mean $\pm$ SD)			
Total	46.1 $\pm$ 12.5	37.1 $\pm$ 12.1	31.2 $\pm$ 12.7
Male	45.7 $\pm$ 14.5	40 $\pm$ 21.2	27.8 $\pm$ 12.8
Female	43.6 $\pm$ 14.6	36.8 $\pm$ 10.8	33.7 $\pm$ 14.8
BCG scar (%)	100	100	100
TST/IGRA results	ND	positive	negative

ND: Not done; TB: tuberculosis; LTBI: latent tuberculosis infection; HC: health control; *BCG*: Bacillus Calmette-Guérin; TST: tuberculin skin test; QFT-IT: QuantiFERON TB Gold in Tube.

**Table 2.** Frequency and expression of cell surface co-stimulatory molecules in monocyte subsets

	Classical			Intermediate			Non-classical		
	HC (TST-)	LTBI (TST+)	Active TB	HC (TST-)	LTBI (TST+)	Active TB	HC (TST-)	LTBI (TST+)	Active TB
Monocytes Frequency	83 ± 6 <sup>†</sup>	86 ± 8 <sup>†</sup>	75 ± 14 <sup>†</sup>	9 ± 4 <sup>†</sup>	8 ± 3 <sup>†</sup>	9.5 ± 5 <sup>†</sup>	8 ± 3 <sup>†</sup>	6 ± 5 <sup>†</sup>	15 ± 11 <sup>†</sup>
HLA-DR	100 <sup>~</sup> 65 <sup>§*</sup> (31.-121) <sup>§*</sup>	100 <sup>~</sup> 105 <sup>§*</sup> (42-210)	100 <sup>~</sup> 136 <sup>§*</sup> (20-1605)	100 <sup>~</sup> 126 <sup>§*</sup> (34.-221)	100 <sup>~</sup> 212 <sup>§**</sup> (58.3-672)	100 <sup>~</sup> 416 <sup>§*</sup> (36-3368)	100 <sup>~</sup> 69 <sup>§**</sup> (28.-126)	100 <sup>~</sup> 86 <sup>§**</sup> (50-237)	100 <sup>~</sup> 220 <sup>§*</sup> (16 -2145)
CD40	1.1 <sup>¤</sup> (0-14) 24 <sup>§</sup> (0-25) <sup>§</sup>	1.1 <sup>¤</sup> (0-14) 24 <sup>§</sup> (0-26)	7.7 <sup>¤</sup> (0-40) 19 <sup>§*</sup> (0-712)	1.1 <sup>¤</sup> (0-14) 24 <sup>§</sup> (0-25)	14 <sup>¤</sup> (0-60) 27 <sup>§</sup> (0-56)	30.2 <sup>¤**</sup> (0-86) 24.3 <sup>§*</sup> (0-879)	1.1 <sup>¤</sup> (0-14) 24 <sup>§</sup> (0-25)	1.6 <sup>¤</sup> (0-9) 20 <sup>§</sup> (0-27)	1.9 <sup>¤**</sup> (0-41) 9 <sup>§*</sup> (0-717)

Monocytes subsets were compared by kruskal-Wallis test followed Dunn's test (n=6-11). (p>0.05)

Study groups (TB and LTBI) were compared by Wilcoxon matched pairs test followed Dunns'test (n=6-8) (p<0.05).

<sup>†</sup> Monocytes subsets frequencies, mean ± SD

<sup>¤</sup> Expression of CD40 frequencies, median (minimum and maximum values)

<sup>~</sup> Expression of HLA-DR frequencies

<sup>§</sup> Median Fluorescence intensity (MFI)

<sup>¤</sup> Expression of CD40 frequencies, median (minimum and maximum values)

\*p≤0.01. In active TB, MFI HLA-DR of intermediate monocytes > MFI HLA-DR classical and non-classical monocytes; MFI CD40 of intermediate monocytes > classical and non-classical monocytes; MFI HLA-DR of non-classical > MFI HLA-DR of non-classical of HC subjects

\*\*p≤0.001. In active TB, the frequency of CD40 intermediate monocytes > Frequency of CD40 classical and non-classical monocytes. In LTBI, MFI HLA-DR intermediate monocytes > MFI HLA-DR non-classical monocytes.

## 4 DISCUSSÃO

A análise dos monócitos circulantes por citometria de fluxo não revelou diferenças nas frequências das subpopulações de monócitos circulantes entre os grupos TB, TBL e controle saudável. No entanto, pacientes com TB tiveram uma discreta diminuição na frequência de monócitos clássicos circulantes comparados aos grupos controle saudável e TBL, além de um discreto aumento na frequência dos monócitos não clássicos circulantes em relação ao grupo TBL. Estes achados são consistentes com os estudos que avaliam as subpopulações de monócitos circulantes em TB (BALBOA et al., 2013; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011).

Sanchez e colaboradores demonstraram que pacientes com TB pulmonar e outras formas de TB possuem maior frequência de monócitos na corrente sanguínea comparado com indivíduos saudáveis (SANCHEZ et al., 2006). Balboa e colaboradores observaram que os pacientes com TB pulmonar apresentam monócitos CD16<sup>+</sup> em maior frequência na circulação sanguínea, enquanto Castaño e colaboradores relacionaram esse aumento com a expansão de monócitos intermediários e não clássicos. (BALBOA et al., 2013; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011). No entanto, Barcelos e colaboradores não encontraram diferenças nas frequências dos monócitos CD16<sup>+</sup> em pacientes com TB, porém avaliaram apenas os monócitos CD16<sup>+</sup> sem distinção entre intermediários e não clássicos. É possível que com um tamanho amostral maior, esta expansão das subpopulações de não clássicos seja evidenciada. O aumento de monócitos não clássicos em TB pode estar relacionado com a função de “patrulhamento” referida a essa subpopulação após estudos moleculares demonstrarem que essa subpopulação possuem maior motilidade que as outras (CROS et al., 2010; WONG et al., 2011). Na infecção pela TB, diversas células, inclusive monócitos, são recrutados até o sítio de infecção na tentativa de controlar a ação do bacilo. Outras doenças, como a sepse por exemplo, relatam o controle da infecção através dos monócitos não clássicos (SKRZECZYŃSKA et al., 2002).

Além das frequências das subpopulações, os níveis de ativação destes subgrupos de monócitos circulantes foram avaliados com o objetivo de compreender melhor os papéis das subpopulações de monócitos na TB e possível relação dessas subpopulações com a susceptibilidade de desenvolver a doença. De acordo com os resultados, os monócitos não clássicos tiveram uma maior expressão de HLA-II em comparação com indivíduos saudáveis. Este achado demonstra que os monócitos não clássicos possuem algum papel na patogênese da TB, pois sua frequência parece estar aumentada neste grupo, como dito anteriormente. Embora

os monócitos não clássicos não sejam a subpopulação mais ativada no grupo TB, quando comparada com controles saudáveis mostraram-se ser a mais ativada. No entanto, não foram observadas diferenças na expressão de CD40 que é uma molécula co-estimulatória importante para ativação das APCs (XU; SONG, 2004).

Embora os monócitos clássicos apresentem-se em maior frequência na corrente sanguínea, os resultados demonstram que os monócitos intermediários são os mais ativados por apresentarem um aumento nos níveis de HLA-DR e CD40. Nossos resultados por citometria de fluxo corroboram com os estudos de avaliação por biologia molecular das subpopulações de monócitos, em que evidenciam um aumento da expressão genética desses marcadores de ativação nos monócitos intermediários (WONG et al., 2011; ZAWADA et al., 2011). De acordo com isto, sugere-se que os monócitos intermediários estejam relacionados com a ação inicial pró-inflamatória da TB por expressarem genes envolvidos na fagocitose, processamento e apresentação de antígenos.

De acordo com alguns estudos em TB, ocorre uma expansão das subpopulações circulantes CD16<sup>+</sup> em pacientes com TB ativa (BALBOA et al., 2013; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011). Dessa forma, avaliou-se as subpopulações de monócitos com a finalidade de compreender melhor essa expansão de monócitos CD16<sup>+</sup> evidenciada na TB. A frequência das subpopulações de monócitos após estimulação antigênica é semelhante entre todos os grupos de estudo, exceto pelos monócitos não clássicos que estão em maior frequência em pacientes com TB e TBL comparados aos indivíduos saudáveis. No entanto, os indivíduos com TB ativa em resposta a LPS tiveram um aumento na frequência de monócitos clássicos e uma redução da frequência dos monócitos não clássicos. Os pacientes com TBL também apresentaram essa expansão de monócitos clássicos tanto em resposta ao LPS como a Mce1A. Embora os pacientes com TB tenham uma diminuição de monócitos não clássicos, este subconjunto ainda assim apresentou-se mais ativado, por apresentar uma alta expressão de HLA-DR, e em maior frequência comparados com os controles saudáveis, sugerindo que a expansão do CD16<sup>+</sup> embora discreta pode ser importante na TB. As frequências de monócitos clássicos aumentaram após estimulação antigênica e observou-se um aumento dos níveis de ativação dessa subpopulação. Balboa e colaboradores também observaram uma expansão dos monócitos CD16<sup>-</sup> em resposta a diferentes concentrações de derivados de Mtb. Além disso, demonstraram que os monócitos clássicos são mais propensos a migrar para o sítio de infecção, possuem maior capacidade de produção de reativos de oxigênio e maior resistência ao crescimento intracelular

bacteriano (BALBOA et al., 2015). Portanto, os monócitos clássicos parecem desempenhar um papel importante no controle da infecção tuberculosa.

No entanto, quando colocadas em cultura as subpopulações de monócitos, observa-se pequenas alterações nas frequências dessas subpopulações em comparação com subgrupos circulantes. Embora os achados não tenham diferenças estatisticamente significante, a frequência dos monócitos clássicos aumenta, assim como a frequência dos monócitos intermediários e não clássicos diminuem, em todos os grupos do estudo, mesmo em cultura sem antígenos. Por alguma razão, os monócitos parecem perder a expressão de CD16 após incubação. A expressão da molécula CD16 por monócitos CD16<sup>-</sup> cultivados na presença de IL-10 foi demonstrada *in vitro* e pode ser uma explicação para a expansão dos subconjuntos CD16<sup>+</sup> encontrados na TB, já que em pacientes com TB a produção de IL-10 pelos monócitos é elevada (CALZADA-WACK; FRANKENBERGER; ZIEGLER-HEITBROCK, 1996). Entretanto, de forma contrária, nossos achados indicam que em resposta a antígenos há uma diminuição de CD16<sup>+</sup>, uma vez que a frequência dos monócitos não clássicos eleva-se em cultura sem antígenos. Zawada e colaboradores demonstraram que monócitos CD16<sup>+</sup> expressam genes apoptóticos e sofrem apoptose após ativação (ZAWADA et al., 2011). No entanto, são necessários mais estudos para a compreensão deste comportamento dos monócitos CD16<sup>+</sup> *in vivo* e *in vitro* na patogênese da TB.

A proteína Mce1A parece estar relacionada com a entrada e permanência dos bacilos dentro das células do hospedeiro (ARRUDA et al., 1993; CHITALE et al., 2001; FLESSELLES et al., 1999; HAILE; BJUNE; WIKER, 2002). Entretanto, não há na literatura nenhum estudo que avalie a resposta celular a Mce1A. Interessantemente, em resposta a Mce1A *in vitro*, os monócitos clássicos de todos os voluntários tiveram frequência aumentada em comparação com a frequência dos monócitos circulantes. Contudo, os monócitos clássicos dos pacientes com TB são os mais ativados em resposta a Mce1A em relação aos indivíduos saudáveis. Apesar dos monócitos clássicos dos pacientes com TB terem uma maior frequência de expressão de CD40 em resposta a Mce1a, os monócitos clássicos dos indivíduos saudáveis demonstraram um aumento na frequência de expressão de CD40 em comparação com os pacientes com TB em resposta a proteína. Estes achados demonstraram que a Mce1A induz maior ativação das subpopulações de monócitos do grupo TB do que do grupo controle saudável expandindo e ativando os monócitos clássicos e intermediários. Além de viabilizar a entrada do bacilo nas células do hospedeiro, a Mce1A está relacionada com a latência do Mtb, o que demonstra o envolvimento desta proteína na ação virulenta do bacilo (HAILE; BJUNE; WIKER, 2002;

SHIMONO et al., 2003) e estes resultados demonstraram o possível papel desta proteína na patogênese da TB.

Está bem relatado na literatura o potencial das subpopulações CD16<sup>+</sup> de produzir TNF, principalmente pelos monócitos não clássicos (BELGE et al., 2002; CROS et al., 2010; WONG et al., 2011). No entanto, nossos resultados demonstraram uma maior expressão (frequência e MFI) de TNF em monócitos intermédios do que em monócitos não clássicos, após a estimulação antigênica, em indivíduos com TB ativa e TBL. Em pacientes com TB ativa, os monócitos intermediários foram os maiores produtores de TNF. Desta forma, foi possível identificar os maiores produtores de TNF entre as duas subpopulações CD16<sup>+</sup> no grupo TB. No entanto, não houve diferença de expressão de TNF entre TB ativa, LTBI e indivíduos saudáveis. Muris e colaboradores demonstraram que a monenzima, normalmente presente nos reagentes utilizados para inibir o transporte de proteínas e então liberação de citocinas para o meio extracelular, afeta a detecção intracelular de IL-10 (MURIS et al., 2012). O autor demonstrou que a detecção intracelular de IL-10 pode cair até 50% o que poderia explicar a dificuldade em detectar esta interleucina pelos monócitos em adição com o pouco tempo de cultura das células. Talvez com um tempo maior de incubação seja possível detectar níveis intracelular de IL-10. A mensuração de IL-10 seria importante para uma melhor compreensão funcional das subpopulações de monócitos na TB, já que é uma citocina anti-inflamatória e estar envolvida no controle da doença.

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de compreender melhor doenças infecciosas através das subpopulações de monócitos. Várias doenças inflamatórias e infecções bacterianas e virais, evidenciam que a expansão das subpopulações de monócitos CD14<sup>+</sup> expressando CD16 parece estar associada ao processo inflamatório e a maior gravidade da doença (AMORIM et al., 2014; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011; HAN et al., 2009; PASSOS et al., 2015; POEHLMANN et al., 2009; SOARES et al., 2006). A exemplo da leishmaniose, Soares e colaboradores observaram que a frequência de monócitos CD16<sup>+</sup> circulantes está aumentada em pacientes com leishmaniose cutânea, além de Passos e colaboradores terem demonstrado que os monócitos intermediários contribuem com a resposta imune durante a infecção por *Leishmania braziliensis*. Entretanto, diferente das outras infecções, em nosso estudo observa-se que na TB há uma expansão e ativação dos monócitos clássicos após estimulação com antígenos. Esta expansão também é observada na co-infecção TB-HIV em pacientes com síndrome inflamatória de reconstituição imunes (IRIS) (ANDRADE et al., 2014).

Esta abordagem em TB é importante uma vez que os monócitos / macrófagos são a primeira linha de defesa da resposta imune contra Mtb. Além disso, ainda não é claro como ocorre a transição do estado de latência para a doença ativa. Embora existam poucos estudos de monócitos em TB, os artigos possuem resultados inconsistentes. Isso ocorre devido a ausência de um modelo padrão com base em marcadores de superfície celular para determinação das subpopulações.

## 5 CONCLUSÃO

As subpopulações de monócitos parecem não desempenhar papel na susceptibilidade de desenvolver TB. De acordo com os nossos resultados, não há diferenças entre as subpopulações de monócitos circulantes entre a fase de latência e ativa da TB, mesmo após estimulação *in vitro*. Entretanto, os monócitos clássicos parecem desempenhar algum papel na infecção da TB, uma vez que esta subpopulação se expande e apresenta-se mais ativada após estimulação antigênica principalmente em resposta a Mce1A. Entretanto, esta expansão de monócitos clássicos na TB ainda precisa ser avaliada



## REFERÊNCIAS

AGUILAR-RUIZ, S. R. et al. Human CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> monocyte subsets display unique effector properties in inflammatory conditions in vivo. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 6, p. 1119–1131, dez. 2011.

AMORIM, C. F. et al. Functional Activity of Monocytes and Macrophages in HTLV-1 Infected Subjects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 18 dez. 2014.

ANDRADE, B. B. et al. Mycobacterial antigen driven activation of CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes is a predictor of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004433, out. 2014.

APPLEBY, L. J. et al. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. **Immunology Letters**, v. 152, n. 1, p. 32–41, abr. 2013.

ARRUDA, S. et al. Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. **Science**, v. 261, n. 5127, p. 1454–1457, 10 set. 1993.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669–692, 2009.

BALBOA, L. et al. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 2, p. 335–347, fev. 2013.

BALBOA, L. et al. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. **Clinical Science**, v. 129, n. 4, p. 319–330, 1 ago. 2015.

BARCELOS, W. et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Immunophenotyping in Pulmonary Tuberculosis Patients before and after Treatment. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 8, p. 597–605, 1 ago. 2006.

BELGE, K.-U. et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 7, p. 3536–3542, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, 2015.

BRIGHENTI, S.; ANDERSSON, J. Local Immune Responses in Human Tuberculosis: Learning From the Site of Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. suppl 2, p. S316–S324, 15 maio 2012.

CALZADA-WACK, J. C.; FRANKENBERGER, M.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. **Journal of Inflammation**, v. 46, n. 2, p. 78–85, 1996.

CASALI, N. et al. Invasion Activity of a Mycobacterium tuberculosis Peptide Presented by the Escherichia coli AIDA Autotransporter. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6846–6852, dez. 2002.

CASALI, N.; RILEY, L. W. A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 60, 26 fev. 2007.

CASTAÑO, D.; GARCÍA, L. F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 348–360, set. 2011.

CHITALE, S. et al. Recombinant Mycobacterium tuberculosis protein associated with mammalian cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 247–254, abr. 2001.

CROS, J. et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 375–386, 24 set. 2010.

EL-SHAZLY, S. et al. Internalization by HeLa cells of latex beads coated with mammalian cell entry (Mce) proteins encoded by the mce3 operon of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1145–1151, 2007.

FLESSELLES, B. et al. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of Mycobacterium bovis BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, n. 2, p. 237–242, 15 ago. 1999.

FLÓRIDO, M.; COOPER, A. M.; APPELBERG, R. Immunological basis of the development of necrotic lesions following Mycobacterium avium infection. **Immunology**, v. 106, n. 4, p. 590–601, ago. 2002.

HAILE, Y.; BJUNE, G.; WIKER, H. G. Expression of the mceA, esat-6 and hspX genes in Mycobacterium tuberculosis and their responses to aerobic conditions and to restricted oxygen supply. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 12, p. 3881–3886, dez. 2002.

HAN, J. et al. CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 52, n. 5, p. 553–559, dez. 2009.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 2, p. 635–643, 15 jul. 1997.

KLUG-MICU, G. M. et al. CD40 ligand and interferon- $\gamma$  induce an antimicrobial response against Mycobacterium tuberculosis in human monocytes. **Immunology**, v. 139, n. 1, p. 121–128, maio 2013.

LU, S. et al. A cell-penetrating peptide derived from mammalian cell uptake protein of Mycobacterium tuberculosis. **Analytical Biochemistry**, v. 353, n. 1, p. 7–14, 2006.

MARINHO, J. et al. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 40, n. 5, p. 625–628, 2005.

MCNERNEY, R. et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205 Suppl 2, p. S147–158, 15 maio 2012.

MURIS, A.-H. et al. Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: The use of protein transport inhibitors revisited. **Journal of Immunological Methods**, v. 381, n. 1–2, p. 59–65, 31 jul. 2012.

NARASIMHAN, P. et al. Risk factors for tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, v. 2013, p. 828939, 2013.

PARKER, S. L.; TSAI, Y. L.; PALMER, C. J. Comparison of PCR-generated fragments of the mce gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 6, p. 770–775, nov. 1995.

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2527–2534, 15 nov. 1989.

PASSOS, S. et al. Intermediate Monocytes Contribute to Pathologic Immune Response in *Leishmania braziliensis* Infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 274–282, 15 jan. 2015.

POEHLMANN, H. et al. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. **Critical Care**, v. 13, n. 4, p. R119, 2009.

SANCHEZ, M. D. et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. **Microbes and infection**, v. 8, n. 9-10, p. 2492–2500, ago. 2006.

SANTHOSH, R. S. et al. Cloning of mce1 locus of *Mycobacterium leprae* in *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 SMR5 and evaluation of expression of mce1 genes in *M. smegmatis* and *M. leprae*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 291–302, 1 ago. 2005.

SATO, N. et al. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. **Journal of Dermatological Science**, v. 46, n. 2, p. 101–110, 1 maio 2007.

SCHOREY, J. S.; CARROLL, M. C.; BROWN, E. J. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1091–1093, 22 ago. 1997.

SCHWARTZ, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, v. 248, n. 4961, p. 1349–1356, 1990.

SHIMONO, N. et al. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the mce1 operon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15918–15923, 23 dez. 2003.

SKINNER, N. A. et al. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in response to sepsis-related antigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 141, n. 2, p. 270–278, ago. 2005.

SKRZECZYŃSKA, J. et al. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monocytes in the Course of Sepsis in Neonates and Small Children: Monitoring and Functional Studies. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 6, p. 629–638, 1 jun. 2002.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 463–496, 1 jul. 2003.

SOARES, G. et al. CD16<sup>+</sup> monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 1, p. 36–39, jan. 2006.

TUFARIELLO, J. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 3, n. 9, p. 578–590, set. 2003.

VAN ALTENA, R. et al. Immunology in tuberculosis: challenges in monitoring of disease activity and identifying correlates of protection. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 27, p. 2853–2862, 2011.

VANHAM, G. et al. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 103, n. 1, p. 30–34, jan. 1996.

WHO. **Global tuberculosis report 2014**. Geneva: World Health Organization, 2014.

WHO | **Global tuberculosis report 2014**. Disponível em: <[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)>. Acesso em: 26 maio. 2015.

WIKER, H. G. et al. The mammalian cell entry operon 1 (mce1) of Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 27, n. 3, p. 173–177, set. 1999.

WONG, K. L. et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v. 118, n. 5, p. e16–e31, 4 ago. 2011.

XU, Y.; SONG, G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. **Journal of Biomedical Science**, v. 11, n. 4, p. 426–438, ago. 2004.

ZAWADA, A. M. et al. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. **Blood**, v. 118, n. 12, p. e50–e61, 22 set. 2011.

ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic Leptospira species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 1006–1023, 1 mar. 2012.

ZHAO, C. et al. Identification of Novel Functional Differences in Monocyte Subsets Using Proteomic and Transcriptomic Methods. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 8, p. 4028–4038, 7 ago. 2009.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 3, p. 584–592, 17 out. 2006.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74–e80, 21 out. 2010.

ZUMLA, A. et al. Viewpoint: Scientific dogmas, paradoxes and mysteries of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tropical Medicine & International Health: TM & IH**, v. 16, n. 1, p. 79–83, jan. 2011.

## ANEXO

## PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA



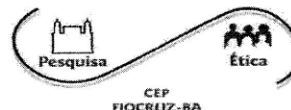
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisas

CEP  
FIOCRUZ-BA

Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

## PARECER FINAL Nº 256/2012

Protocolo: 365/ 2011

**Projeto de Pesquisa:** “DISTINGUINDO TUBERCULOSE ATIVA E LATENTE: UM ESTUDO DE COORTE”.Pesquisador(a) Responsável: Dr. Sérgio Marcos ArrudaInstituição ou Departamento: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao pesquisador responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado, com algumas recomendações a seguir:

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatório parcial e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

Vigência: 03/08/2012 a 02/08/2017.Relatórios parciais: 02/08/2013 - 02/08/2014 - 02/08/2015 - 02/08/2016.Relatório final: 02/09/2017.

Salvador, 21 de Setembro de 2012.

**Adriana Lanfredi Rangel**

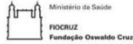
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

CPqGM/FIOCRUZ

IORG-0002090 / IRB-00002612

## APÊNDICE

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COMUNICANTES DOMICILIARES



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Comunicante domiciliar

O(a) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa intitulada "Distinguindo tuberculose ativa e latente: Estudo de coorte" coordenado pelo Dr. Sérgio Marcos Arruda. O objetivo da pesquisa é descrever o comportamento sócio-demográfico, clínico, laboratorial e fatores de risco associados ao diagnóstico da tuberculose ativa e latente nos pacientes e em seus respectivos comunicantes domiciliares.

Para isso, caso o(a) Sr(a) concorde em participar desta pesquisa deverá responder a um questionário específico, realizar exame parasitológico de fezes para identificação de infecções parasitárias e doar 20 mL de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa, para os exames laboratoriais. Além disso, alguns dados referentes aos procedimentos de rotina feitos no 6º Centro de Saúde Rodrigo Argolo serão retirados do seu prontuário, tais como o resultado do teste cutâneo tuberculínico e radiografia do tórax.

Dos 20 mL de sangue doados, 4 mL serão destinados à realização do hemograma completo, 5 mL para a dosagem dos parâmetros bioquímicos (albumina, TGO, TGP, creatinina, uréia e glicemia em jejum), 3 mL serão utilizados para cultura do células e cerca de 4 mL utilizado para dosar moléculas presentes no sangue (tais como: interleucinas, interferons, fator de transformação do crescimento e fator de necrose tumoral). Os 4 mL restantes serão destinados para mensurar anticorpos e moléculas no sangue em resposta a proteína Mce1A. Dos exames citados acima, os resultados do hemograma, a dosagem dos parâmetros bioquímicos e o exame parasitológico de fezes serão entregues para o(a) Sr(a). Além disso, se for da vontade do(a) Sr(a) o excedente do sangue será utilizado para diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). Para a realização deste teste sorológico será feito aconselhamento pré e pós-teste pela médica Dra Teresinha Ferreira e/ou pela enfermeira Eurides dos Santos. Estas profissionais de saúde fornecerão informações sobre a natureza do teste, significado dos seus resultados e quando necessário a forma de acompanhamento e tratamento. Se for do seu interesse o resultado do teste sorológico será devolvido para o(a) Sr(a). Caso o resultado seja positivo para o vírus, o(a) Sr(a) será encaminhado para o Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, onde serão tratados e acompanhados adequadamente.

A coleta de sangue será realizada com material descartável, podendo provocar um pequeno desconforto temporário causado pela picada da agulha, ardência e muito raramente hematoma (roxo), que habitualmente melhora em algumas horas ou poucos dias.

Informo ainda que, caso seja do interesse do(a) Sr(a), serão convidados a retornarem depois de 3, 6, 12 e 24 meses para uma nova avaliação clínica e repetição dos exames citados acima. E portanto, se for da vontade do(a) Sr(a), um novo termo de consentimento será aplicado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade, bastando para isso entrar em contato com o pesquisador responsável. A sua não participação na pesquisa não afetará, de forma alguma, o seu tratamento.

Informamos que o(a) Sr(a) não será beneficiado(a) diretamente. Esclarecemos que os resultados do teste de sangue e as informações que der ao médico contribuirão para sabermos o perfil da doença em um local de alta prevalência.

O(a) Sr(a) tem a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa. Isso poderá ser feito através do pesquisador responsável pelo estudo Dr. Sérgio Arruda (telefone para contato: 3176-2310 ou 3176 2232) ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-Ba, CEP: 40296-710.

Toda e qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial e sigilosa sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual do(a) Sr(a).

Este termo é composto de duas vias de igual conteúdo, sendo a primeira para arquivamento pelo pesquisador coordenador e a segunda para o voluntário. Se aceitar participar do estudo, por favor, assine ao final do documento concordando em fazer parte da pesquisa.

1. Aceito doar sangue para realização do diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus linfotrópico humano:  
 Sim  Não

2. Gostaria de saber o resultado do teste diagnóstico:  
 Sim  Não

3. Autorizo o armazenamento do meu material biológico (sangue) para fins de pesquisas futuras, desde que aprovados pelo Comitê de Ética:  
 Sim  Não

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar deste estudo por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do (a) participante \_\_\_\_\_

Impressão datiloscópica (em caso de não saber assinar o nome)



Assinatura do(a) médico(a) entrevistador(a): \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA SINTOMÁTICOS RESPIRATÓRIOS



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Sintomático Respiratório

O(a) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa intitulada "Distinguindo tuberculose ativa e latente: Estudo de coorte" coordenado pelo Dr. Sérgio Marcos Arruda. O objetivo da pesquisa é descrever o comportamento sócio-demográfico, clínico, laboratorial e fatores de risco associados ao diagnóstico da tuberculose ativa e latente nos pacientes e em seus respectivos comunicantes domiciliares.

Para isso, caso o(a) Sr(a) concorde em participar desta pesquisa deverá responder a um questionário específico e doar 8 mL de sangue, o equivalente a uma colher de sobremesa, para os exames laboratoriais. Além disso, alguns dados referentes aos procedimentos de rotina feitos no 6º Centro de Saúde Rodrigo Argolo serão retirados do seu prontuário, tais como o resultado da baciloscopia do escarro, exame de sangue (hemograma, dosagem de enzimas do fígado), sorologia para o vírus da imunodeficiência humana e radiografia do tórax.

Dos 8 mL de sangue doados, 4 mL serão destinados para obtenção do soro, no qual será dosado moléculas presentes no sangue (tais como: interleucinas, interferons, fator de transformação do crescimento e fator de necrose tumoral). Os 4 mL restantes serão destinados para mensurar anticorpos e moléculas no sangue em resposta a proteína Mce1A. Se for da vontade do(a) Sr(a) o excedente do sangue será utilizado para diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). Para a realização deste teste sorológico será feito aconselhamento pré e pós-teste pela médica Dra Teresinha Ferreira e/ou pela enfermeira Eurides dos Santos. Estas profissionais de saúde fornecerão informações sobre a natureza do teste, significado dos seus resultados e quando necessário a forma de acompanhamento e tratamento. Se for do seu interesse o resultado do teste sorológico será devolvido para o(a) Sr(a). Caso o resultado seja positivo para o vírus, o(a) Sr(a) será encaminhado para o Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, onde serão tratados e acompanhados adequadamente.

A coleta de sangue será realizada com material descartável, podendo provocar um pequeno desconforto temporário causado pela picada da agulha, ardência e muito raramente hematoma (roxo), que habitualmente melhora em algumas horas ou poucos dias.

Informo ainda que, caso seja do interesse do(a) Sr(a), serão convidados a retornarem depois de 2 a 6 meses para uma nova avaliação clínica e repetição dos exames citados acima. E portanto, se for da vontade do(a) Sr(a), um novo termo de consentimento será aplicado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade, bastando para isso entrar em contato com o pesquisador responsável. A sua não participação na pesquisa não afetará, de forma alguma, o seu tratamento.

Informamos que o(a) Sr(a) não será beneficiado(a) diretamente. Esclarecemos que os resultados do teste de sangue e as informações que der ao médico contribuirão para sabermos o perfil da doença em um local de alta prevalência.

O(a) Sr(a) tem a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa. Isso poderá ser feito através do pesquisador responsável pelo estudo Dr. Sérgio Arruda (telefone para contato: 3176-2310 ou 3176 2232) ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-Ba, CEP: 40296-710.

Toda e qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial e sigilosa sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual do(a) Sr(a).

Este termo é composto de duas vias de igual conteúdo, sendo a primeira para arquivamento pelo pesquisador coordenador e a segunda para o voluntário. Se aceitar participar do estudo, por favor, assine ao final do documento concordando em fazer parte da pesquisa.

1. Aceito doar sangue para realização do diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus linfotrópico humano:

Sim  Não

2. Gostaria de saber o resultado do teste diagnóstico:

Sim  Não

3. Autorizo o armazenamento do meu material biológico (sangue) para fins de pesquisas futuras, desde que aprovados pelo Comitê de Ética:

Sim  Não

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar deste estudo por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do (a) participante \_\_\_\_\_

Impressão datiloscópica (em caso de não saber assinar o nome)



Assinatura do(a) médico(a) entrevistador(a): \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_