

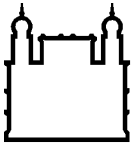
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**RESPOSTA IMUNE POR SUBCLASSES DE IgG À DIFERENTES PROTEÍNAS
MICOBACTERIANAS.**

NIDAI DE BARBARA MOREIRA DA SILVA LINS

Rio de Janeiro
Janeiro 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Nidai de Barbara Moreira da Silva Lins

Resposta Imune por subclasses de IgG à diferentes proteínas micobacterianas.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Prof^a. Dr^a.Maria Helena Féres Saad
Prof. Dr.Leonardo Silva de Araujo

RIO DE JANEIRO
Janeiro de 2017

Lins, Nidai de Barbara Moreira da Silva .

Resposta Imune por subclasses de IgG à diferentes proteínas micobacterianas / Nidai de Barbara Moreira da Silva Lins. - Rio de Janeiro, 2017.

85 f.; il.

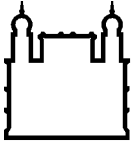
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Maria Helena Féres Saad .

Co-orientador: Leonardo Silva de Araujo.

Bibliografia: f. 57-66

1. Subclasses de IgG. 2. Tuberculose . 3. Resposta imune. 4. Infecção latente (LTBI). 5. Anticorpos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: NIDAI DE BARBARA MOREIRA DA SILVA LINS

*RESPOSTA IMUNE POR SUBCLASSES DE IgG À DIFERENTES PROTEÍNAS
MICOBACTERIANAS*

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr^a. Maria Helena Féres Saad
Prof. Dr. Leonardo Silva de Araújo**

Aprovada em: 31/01/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro - Presidente (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr^a. Verônica Schmitz Pereira - Membro Titular (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr^a. Maria da Glória Bonecini Almeida - Membro Titular (INI/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Walter Oelemann - Membro Suplente (UFRJ)
Prof. Dr. Paulo Antas - Membro Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 31 de Janeiro de 2017

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente aos meus pais, Paulo Inácio da Silva e Marilea Ferreira Moreira, meu esposo Diego Pimentel Lins. Por todo amor, dedicação e incentivo que sempre me proporcionaram. Graças a vocês que são meu alicerce consigo realizar meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e Meishu-Sama, pela força e luz em todos os momentos me permitindo superar os obstáculos e realizar mais essa etapa de minha vida.

Aos meus pais Paulo e Marilea pelo amor, carinho, incentivo e dedicação incondicional que sempre me dedicaram durante toda vida. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu esposo Diego por todo amor, companheirismo, dedicação, cumplicidade e compreensão em todos os momentos me incentivando a superar as dificuldades e alcançar meus objetivos. Agradeço imensamente.

À minha orientadora, Dr^a Maria Helena Féres Saad do Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, pela confiança, apoio, dedicação, compreensão. E pela fundamental participação para elaboração desta dissertação compartilhando seus conhecimentos, acrescentando para minha formação. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Leonardo Silva de Araujo, por sua orientação, incentivo e paciência, sempre compartilhando seus conhecimentos comigo. E principalmente por seu total apoio e dedicação para confecção desta dissertação. Agradeço imensamente.

Ao MSc Renan Jeremias da Silva, pelo seu apoio e contribuição cedendo às amostras de plasmas de pacientes utilizadas neste estudo. Sua contribuição foi valiosa para construção deste trabalho. Muito obrigada.

Aos amigos queridos do laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, Adolfo Barreto, Silvia Maria Almeida Machado e Isabela Gama Sardella, em especial Carla Mullinari, pelo apoio, transmissão de conhecimentos e companheirismo. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Muito Obrigada.

À Fundação Oswaldo Cruz/IOC pelo apoio institucional, cujas estruturas possibilitaram a realização deste trabalho. Muito Obrigada.

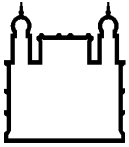
A todos meus familiares, irmãos, tios, primos, sobrinhos por todo incentivo motivacional, carinho amizade e pela compreensão de minha ausência em muitos momentos que eu estava dedicada aos estudos. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os amigos, colegas de faculdade e amigos da igreja por sempre me proporcionarem momentos de conforto, alegria, incentivo e carinho. Por também compreenderem minha ausência em alguns momentos e continuarem ao meu lado me oferecendo apoio e amizade.

A pós-graduação de Medicina Tropical por todo apoio, incentivo e assistência. Muito obrigada.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001" e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro – FAPERJ pelo auxílio financeiro. Muito Obrigada.

“Lutar pelo bem-estar do próximo é a condição fundamental para nos tornarmos felizes” Meishu-Sama



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESPOSTA IMUNE POR SUBCLASSES DE IgG A DIFERENTES PROTEÍNAS MICOBACTERIANAS.

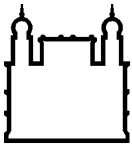
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Nidai de Bárbara Moreira da Silva Lins

A Organização Mundial da Saúde estima que, em 2014, a tuberculose (TB) foi responsável por cerca de 10,4 milhões de casos novos e 1,5 milhões de óbitos em todo o globo. Embora os casos de TB venham diminuindo, o número de indivíduos latentemente infectados (LTBI) é alto, formando um importante reservatório de bacilos. Os mecanismos da manutenção de uma LTBI ou progressão para doença ainda não estão completamente elucidados. A resposta imune mediada por células com produção de interferon gama (IFN- γ), dentre outras citocinas, é crucial na resposta contra a TB. Embora anticorpos sejam produzidos contra diferentes antígenos micobacterianos na TB, são considerados não protetores. O fato é que ainda pouco se sabe do seu papel no balanço da resposta imune nas diferentes fases da infecção, particularmente às subclasses de IgG. Assim, o presente estudo objetiva investigar a imunoreatividade, por teste imunoenzimático (ELISA) de subclasses de IgG, frente aos antígenos micobacterianos associados à fase de latência (Rv2031c, Rv2628, Rv2034, Rv2029c), à infecção (ESAT6:CFP10 e Rv3353) e uma quimera proteica com potencial de diagnóstico da LTBI, recém-sintetizada por nosso grupo (PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP-10). Utilizando a técnica de ELISA indireto, foram analisadas 115 amostras de plasma, sendo 24 de casos de TB confirmada e 91 de contatos recentemente expostos (rCt) a TB pulmonar bacilíferos. Os rCt foram classificados pelo teste cutâneo à tuberculina (TCT) e pelo ensaio de liberação de IFN- γ de longa estimulação (LSA) em: LTBI (TCT/LSA⁺, n=24); provável LTBI (TCT/LSA discordantes, n=42); e controles não-infectados (TCT/LSA⁻, n=25). Pacientes com TB ativa apresentam um perfil imunodominante (p<0,05) de IgG1-ESAT6:CFP10, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP-10, Rv2628, Rv3353, Rv2034 e Rv2029. Interessantemente, significativa baixa-produção de IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353 e IgG3-Rv2034 (p<0,05) foi observada nos TB vs rCt sugerindo uma possível função protetora nos rCt-LTBI. De fato, a alta produção de IgG3-Rv2034 mostrou excelente discriminação entre LTBI vs TB (sensibilidade [S]=100%; especificidade [E]=91%). A combinatória de IgG1-ESAT6:CFP10_{>151}/IgG2-Rv3353_{<51} mostrou potencial imunodiagnóstico na TB (S=88%; E=100%). Entretanto, embora com menor Sp, o uso de resultados combinatórios também foi mais promissor na detecção de LTBI (S = 80%, Sp = 69,5%), do que o uso de antígenos único (S <48%, Sp <91%). Estudos adicionais serão necessários para corroborar a potencial utilização das combinatórias na detecção de TB ativa e o papel da resposta IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, -Rv3353 e IgG3-Rv2034 na proteção da progressão de LTBI. O presente estudo demonstrou que a resposta por subclasses de IgG pode ser dinâmica na TB/infecção, de acordo com a especificidade para os antígenos alvos, e pela primeira vez isotipos de IgG foram avaliados para os antígenos PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 and Rv2034.

Palavras Chaves: Subclasses de IgG, Tuberculose, Resposta imune, Infecção latente (LTBI), Anticorpos, ELISA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMMUNE RESPONSE BY IgG SUBCLASSES TO DIFFERENT MYCOBACTERIAL PROTEINS.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Nidai de Barbara Moreira da Silva Lins

According to the World Health Organization, in 2014, TB caused approximately 10.4 million new cases and 1.5 million deaths worldwide. Although active TB cases are declining worldwide, the number of latent TB infected (LTBI) is high, composing an important reservoir of bacilli. The mechanisms involved in the maintenance of a LTBI or progression to disease have not yet been fully understood. Cell-mediated immune response with interferon gamma (IFN- γ) production, among other cytokines, is crucial in the response to TB. Although antibodies are also produced against different mycobacterial antigens in TB, there is still a gap in the knowledge about their role in immune response balance at different stages of infection, particularly IgG subclasses. Thus, the present study aims to investigate the immunoreactivity, by titration of IgG subclasses, against different mycobacterial antigens, latency-associated (Rv2031c, Rv2628, Rv2034 and Rv2029c), to the infection (ESAT6:CFP10 and Rv3353), and to a new chimera with the diagnostic potential of LTBI recently synthesized by our group (PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎: CFP-10). Using the indirect ELISA technique, 115 plasma samples were analyzed, 24 of which were from confirmed cases of TB and 91 from recently close contacts (rCt) exposed to a pulmonary TB. The rCt were classified according to: the tuberculin skin test (TST) and the long-term IFN- γ release assay (LSA) in: LTBI (TST/LSA⁺, n=24); Probable LTBI (TST/LSA, discordant n=42); and uninfected controls (TST/LSA⁻, n=25). Patients with active TB showed an immunodominant profile of ($p < 0.05$) IgG1-ESAT6:CFP10, Rv2628, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, Rv3353, Rv2034, Rv2029. Interestingly, significant low-production of IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353 and IgG3-Rv2034 ($p < 0.05$) was observed in TB vs rCt suggesting a possible protective function of this antibodies in rCt-LTBI. In fact, the high production of IgG3-Rv2034 showed excellent discriminatory power between LTBI vs TB (sensitivity [S] = 100%, specificity [Sp] = 91%). The combinatoriy of IgG1-ESAT6: CFP10^{>151}/IgG2-Rv3353^{<51} results showed immunodiagnostic potential for TB (S = 88%; Sp = 100%). Although with lower Sp, the use of combinatorial results were also more promising in the detection of LTBI (S = 80%, Sp = 69.5%), than using single antigens (S \leq 48%, Sp \leq 91%). Further studies are needed to corroborate the potential use of the combinatorial IgG1-ESAT6: CFP10 / IgG2-Rv3353 in the detection of active TB and the role of the IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 and -Rv3353 and IgG3-Rv2034 response in the protection of LTBI progression. The present study demonstrated that IgG subclasses response may be dynamic according to Sp for target antigens, and for the first time presented the IgG subtypes profile for the antigens PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 and Rv2034 .

Keywords: IgG subclasses, tuberculosis, immune response, latent tuberculosis infection (LTBI).

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. Introdução	1
1.2 Revisão Bibliográfica	3
1.1.1 Histórico e descoberta da tuberculose	3
1.1.2 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.1.3 Epidemiologia	5
1.1.4 Métodos diagnósticos	6
1.1.5 Imunologia e patogênese da tuberculose	8
1.1.6 Resposta de Células B e humoral	9
1.1.7 Imunoglobulinas	11
1.1.8 Antígenos:	12
1.3 Justificativa	14
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Considerações Éticas	16
3.2 Tipo e Desenho do Estudo:	16
3.3 Critérios de inclusão:	17
3.4 População de estudo:	17
3.4.1 Pacientes com Tuberculose:	17
3.4.2 Contatos recentes de pacientes com TB (rCt)	18
3.5 Ensaio de liberação de IFN-γ (IGRA)	20
3.6 Dosagem de interferon-gama nos sobrenadantes de cultura.	20
3.7 Dosagem de subclasses de IgG por ELISA	21
3.8 Antígenos	22
3.9 Análises dos resultados	22
4. Resultados	23

4.1 Características clínicas e demográficas	23
4.2 Resposta humoral por subclasses de IgG.	25
4.3Imunoreatividade de Subclasses de IgG a diferentes antígenos micobacterianos.	26
4.4 Análises de Razão de Chances	38
4.5 Árvore de Classificação	40
4.6 Correlação entre a resposta humoral e celular	42
5. Discussão	45
6. conclusão	54
7. Perspectivas	55
8. Referencias Bibliográficas	56
9. Apêndice e Anexos	66
9.1 Anexo.1 - Aprovação Comitê de Ética	66
9.2 Anexo.2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67

Índice de Figuras

Figura 1.1- Esfregaço, de cultura obtida de meio sólido, corado por Ziehl Nielsen A) Formação de fator corda de <i>M. tuberculosis</i> , B) aspecto corda negativo de <i>Mycobacterium avium</i>	5
Figura 1.2 - Estimativa global de casos incidentes de tuberculose em 2015.....	5
Figura 3.1 - Fluxograma da população estudada de rCt e TB, arrolada previamente de acordo com Araújo et al, 2015 e Silva et al, 2014.....	19
Figura 4.1 - Resposta imune humoral, expressa em mediana e intervalo interquartil, por isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 à um painel de antígenos micobacterianos (Rv2031c, Rv2628, ESAT6:CFP10, PstS1(285-374):CFP10, Rv2034, Rv2029c, Rv3353) em amostras de plasma de indivíduos saudáveis contatos recentes de pacientes com tuberculose (TB) agrupados pela resposta ao teste cutâneo a tuberculina (TCT) e de liberação de interferon-gama.....	27
Figura 4.2 - Árvore de classificação utilizando a combinatória das repostas de IgG1-ESAT6:CFP10, IgG3-Rv2034, IgG1-PstS1(285-374):CFP10, IgG2-Rv3353, expressas em D.O.....	41

Lista de Tabelas

- Tabela 4.1** – Características clínicas e demográficas dos 91 indivíduos contatos recentes (rCt) incluídos no estudo.....**23**
- Tabela 4.2** – Dados clínicos e epidemiológicos dos 24 pacientes TB incluídos no estudo.....**24**
- Tabela 4.3** – Resultados das padronizações de ELISA com os pools positivo e negativo de indivíduos contatos recentes de pacientes com tuberculose com teste cutâneo a tuberculina positivo e negativo, respectivamente.....**25**
- Tabela 4.4** – Valores de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e área sob a curva ROC (AUROC) para as respostas IgG1 contra os antígenos selecionados nas comparações entre os Grupos controle (Grupo I), LTBI (Grupo II) e TB (Grupo VI)..**30**
- Tabela 4.5** – Valores de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e área sob a curva ROC (AUROC) para as respostas IgG2 contra os antígenos selecionados nas comparações entre os Grupos controle (Grupo I), LTBI (Grupo II) e TB (Grupo VI)..**33**
- Tabela 4.6** – Valores de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e área sob a curva ROC (AUROC) para as respostas IgG3 contra os antígenos selecionados nas comparações entre os Grupos controle (Grupo I), LTBI (Grupo II) e TB (Grupo VI)..**36**
- Tabela 4.7** – Variáveis clínicas e epidemiológicas associadas à positividade nos teste ELISA entre os contatos recentes de pacientes com TB (rCt) e pacientes com tuberculose ativa (TB), via análises de odds ratio. Foram selecionados apenas os testes que apresentaram altos valores de AUROC (>0,74): IgG1-ESAT-6:CFP-10, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, Rv3353, IgG2 -Rv3353 e IgG3 -RV2034.....**39**
- Tabela 4.8** – Valores de correlação de Spearman entre os níveis séricos de subclasses de IgG específicos para os ensaios de ELISA IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, IgG3-Rv2034 e a produção de interferon-gama em ensaios de longa estimulação (LSA) para o Grupo I - controle.....**42**

Tabela 4.9 – Valores de correlação de Spearman entre os níveis séricos de subclasses de IgG específicos para os ensaios de ELISA IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, IgG3-Rv2034 e a produção de interferon-gama em ensaios de longa estimulação (LSA) para o Grupo II - LTBI.....**43**

Tabela 4.10 – Valores de correlação de Spearman entre os níveis séricos de subclasses de IgG específicos para os ensaios de ELISA IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, IgG3-Rv2034 e a produção de interferon-gama em ensaios de longa estimulação (LSA) para o Grupo III.....**44**

Lista de Siglas e Abreviaturas

°C	Graus Celsius
Ac	Anticorpos
Ag	Antígeno
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AUC	Área sob a curva
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BE1	Linfócito B efetor 1
BE2	Linfócito B efetor 2
CFP-10	Proteína do filtrado de cultura de 10 kDa
Con-A	Concanavalina-A
DC	Células dendríticas
DO	Densidade óptica
DosR	<i>Dormancy survival regulon</i>
DP	Desvio padrão
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
ESAT-6	6 kDa <i>early secretory antigenic target</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IC	Intervalo de Confiança
IDT	Instituto de Doenças do Tórax
IFN- γ	Interferon Gama
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse imunoglobulina G1
IgG2	Subclasse imunoglobulina G2
IgG3	Subclasse imunoglobulina G3
IgM	Imunoglobulina M
IGRA	<i>Interferon gamma release assays</i> (ensaios de liberação de IFN- γ)
IL	Interleucina
INI	Instituto Nacional de Infectologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPT	Tratamento profilático Isoniazida
kDa	KiloDalton
LAA	<i>Latency-associated antigens</i> (antígenos associados a latência)
LAMICEL	Laboratório de Microbiologia Celular
LB	Linfócitos B
LJ	Lowenstein Jansen
LSA	<i>Long-term stimulation assay</i> (ensaios de longa estimulação - 5 dias)
LTBI	<i>Latent tuberculosis infection</i> (Infecção de tuberculose Latente)

MDR	Multidroga resistência
MHCII	Complexo de histocompatibilidade de classe II
MΦ	Macrófagos alveolares
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PEES	Penicilina e estreptomicina
PRR	<i>Pattern recognition patterns</i> (receptores de reconhecimento padrão)
PstS1	Lipoproteína transportadora de fosfato periplasmático 1
QFT-GIT	QuantiFERON-TB Gold In-Tube
rCt	Contatos recentes de pacientes com tuberculose ativa
RD1	Região de diferença 1
ROC	Receiving Operating Characteristic
RR-TB	Tuberculose resistente a rifampicina
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
T CD4+	Linfócitos timo-dependentes CD4+
T CD8+	Linfócitos timo-dependentes CD8+
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCT	Teste cutâneo à tuberculina
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
ZN	Ziehl-Neelsen
WBA	<i>Whole-blood assay</i> (Ensaio de estimulação com sangue total - 22h)

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença transmissível, de apresentação geralmente crônica e tem por agente etiológico as micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* e *M. caprae*) em humanos e/ou animais (Drancourt 2008, Niemann et al. 2016). A TB é uma das doenças infecciosas de maior impacto sobre o ser humano, afligindo a humanidade desde a antiguidade (Daniel 2006). Ainda hoje, a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 2014, estima que 10,4 milhões de casos novos e 1,5 milhões de óbitos ocorrem devido a esta moléstia (WHO 2016).

A longa história de interação com o *Homo sapiens* parece ter levado *M. tuberculosis* a desenvolver mecanismos diversos para subverter a resposta imune do hospedeiro, mas o sistema imune também é capaz de conter a disseminação bacilar exacerbada, na maioria dos casos. Estima-se que, após a infecção por *M. tuberculosis*, apenas 5 a 15% devem progredir para TB ativa, principalmente entre o segundo e quinto ano pós-infecção inicial. Os demais infectados serão capazes de conter a disseminação bacilar, através da formação de granulomas, mas não de eliminar totalmente os bacilos, caracterizando uma infecção assintomática denominada de tuberculose latente (do inglês, “*latent tuberculosis infection*” – LTBI). Sabe-se que alguns indivíduos também são capazes de erradicar eficientemente a infecção, mas dados sobre a frequência em que isto ocorre são escassos (Teixeira et al. 2007, Diel et al. 2011, Brites & Gagneux 2015).

Apesar de ser uma doença tão antiga quanto o homem, a imunopatogênese da TB ainda não está completamente elucidada, principalmente o entendimento sobre quais fatores contribuem para a manutenção da LTBI ou progressão para TB ativa. Sabe-se, entretanto, que a infecção por vírus da imunodeficiência humana / síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), diabetes, desnutrição, uso de medicação imunossupressora, alcoolismo, silicose, insuficiência renal e doenças pulmonares crônicas, estão entre os fatores de risco para TB (CDC 2013). Do ponto de vista da resposta imune do hospedeiro sabe-se que a imunidade celular é de grande importância na manutenção do granuloma, que é formado por uma bem organizada variedade de células do sistema imune e, embora grande atenção seja dada aos componentes da resposta imune celular, como a produção de interferon gama (IFN- γ) por linfócitos T helper (Th) 1 (Keane et al. 1997, Agnaldo et al. 2006), é descrito que a mudança de um

perfil de resposta Th1 para Th2 é um dos principais fatores na progressão de LTBI para TB (Djoba Siawaya et al. 2007).

Por outro lado, o auxílio de anticorpos na contenção da disseminação bacilar, seja pela opsonização do bacilo, por modulações pró- ou anti- inflamatórias ativadas por receptores celulares para sua fração cristalizável (FcR), ou através de interações com a imunidade mediada por células, tem sido debatido e demonstrado em vários estudos (Achkar et al. 2015, Jacobs et al 2016). A resposta de IgG para diferentes tipos de antígenos pode ser direcionada para determinadas subclasses, dependendo do tipo da resposta imune secundária, as quais variam dependendo do tipo do antígeno (Vidarsson et al. 2014). Embora IgG1 e IgG3 sejam predominantes na TB apenas a IgG3 está associada a liberação de fator de necrose tumoral (TNF- α) por monócitos do hospedeiro (Sousa et al. 1998, Hussain et al. 2000). Infecção em modelo murinos por outros microrganismos intracelulares, tais como *Cryptococcus neoformans*, a IgG3 diminui a sobrevivência do animal mas a indução de IgG1 confere proteção (Yuan et al. 1995), o que foi similarmente descrito na infecção por *M. tuberculosis* (Achkar et al. 2014). Portanto, a variabilidade dos locos Ig parece otimizar ou afinar a resposta imune mediada por anticorpos.

Todavia, ainda não está bem esclarecido a imunogênicidade de diferentes antígenos para indução de produção de subclasses de IgG, bem como sua relevância com estado clínico do indivíduo, LTBI ou TB ativa. Mecanismos coevolutivos podem contribuir para a alta complexidade e dinâmica nas interações entre *M. tuberculosis* e o hospedeiro humano, onde tanto o bacilo é capaz de modular o seu metabolismo em resposta a estresses/estímulos causados pela resposta imune do hospedeiro, como células do sistema imune são moduladas por componentes micobacterianos. Essa orquestração parece ser sutil e dinâmica de modo que, mesmo antígenos micobacterianos proteicos simples e essenciais, para a micobactéria, levam a indução de diferentes respostas em hospedeiros com TB pulmonar e bacilíferos (Pieters 2008).

Assim, estudos que possam favorecer um melhor entendimento da resposta imune humoral e celular a antígenos micobacterianos é importante para elucidar mecanismos de patogênese e, contribuir para o desenvolvimento de novas formas de prevenção, diagnóstico e tratamento.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Breve Histórico da tuberculose

A partir de técnicas moleculares, estima-se que *M. tuberculosis* possa ter infectado os primeiros homínídeos na África oriental cerca de 3 milhões de anos atrás. É provável que todos os membros modernos do complexo *M. tuberculosis* tiveram um ancestral comum africano (Gutierrez et al. 2005). Em múmias egípcias, ~3.000 anos a.C., foram encontrados fragmentos da coluna vertebral com alterações que indicavam a presença da doença de Pott, e o DNA de *M. tuberculosis* foi amplificado de seus tecidos (Petronis et al. 1997, Eric Crubézy et al. 1998). A doença foi descrita por Hipócrates (460–375 a.C.) na Grécia, com o nome de phthisikós (*gr.*) ou seja, que traz consumpção, daí vem o termo tísico que designava o indivíduo tuberculoso, reconhecendo inclusive sua predileção pelo jovem adulto (Adams 1985). O termo tuberculose foi usado por Johann Lukas Schönlein e mais tarde por Hermann Brehmer, Jean Antoine Villemin e Robert Koch (Herzog 1998, Daniel 2000).

Há evidências de que a TB se espalhou globalmente causando grandes epidemias (Daniel 2006). Nas Américas as primeiras evidências vêm da região andina, a partir do tecido mumificado de criança (700 anos d.C) no Peru (Gerszten et al. 2012). Estes e outros achados arqueológicos evidenciam a presença da doença nas Américas mesmo antes da chegada dos europeus. Sugere-se que as epidemias na população indígena, após contato com europeus, ocorreram devido às cepas europeias transmitidas serem mais virulentas (Darling & Donoghue 2014).

O evento da revolução industrial na Inglaterra (sec.18-19), que se estendendo pela Europa, multidões operárias concentraram-se nos centros urbanos, em condições precárias, favorecendo a disseminação da TB com elevados índices de casos e mortalidade, pois as ferramentas de tratamento ainda eram rudimentares devido ao pouco conhecimento de sua etiopatologia. Nesta época a doença era também denominada de peste branca (Sardella 2008).

Robert Koch, em março de 1882, identificou e isolou o agente causador da TB, *M. tuberculosis* ou bacilo de Koch. Seu estudo possibilitou comprovar a característica de transmissibilidade do bacilo, previamente mencionada por Villemin (1865), e levou a tomada de medidas de saúde pública para conter a transmissão da TB (Daniel 2006). O advento da quimioterapia, iniciada com a administração de estreptomicina em 1944, e

posteriormente com a introdução de isoniazida (1955), etambutal (1962) e rifampicina (1963), lançou as bases para a cura da TB (Marcos & Gomes 2013).

1.1.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Taxonomicamente, as micobacterias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacteriacea (Campos 2006). As espécies do complexo *M. tuberculosis* se apresentam como bastonetes imóveis, finos, retos ou ligeiramente curvos, não encapsulados. São aeróbios, não formam esporos, com tamanho que varia entre 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura. São classificadas como não pigmentadas e de crescimento lento comparadas às outras bactérias, em que o tempo de geração é de minutos, seu tempo de geração varia em torno de 12-24 horas dependendo do meio de cultura utilizado para seu crescimento (Marcos & Gomes 2013).

Possui DNA com elevada porcentagem de guanina e citosina, são caracterizados como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) devido a sua parede celular rica em lipídeos, entre os quais os ácidos micólicos que conferem resistência a descoloração por solução álcool-ácido, após a coloração com fucsina básica pelo método de Ziehl-Nielsen (Figura 1.1). Não são bem coradas pela técnica de Gram, porém podem ser consideradas Gram positivas. A rica camada de lipídios também confere resistência aos desinfetantes, à dissecação, e a característica de hidrofobicidade da membrana (Campos 2006, Brasil 2008). Os lipídios da parede celular, juntamente com outras proteínas secretadas ou exportadas de *M. tuberculosis*, foram descritos como importantes moduladores da resposta imune do hospedeiro, pois, torna o bacilo impermeável à variadas moléculas, atuando na proteção contra os mecanismos bactericidas do hospedeiro o que confere resistência a penetração de ácidos, mas não o protege da ação de agentes físicos como o calor, luz solar e radiação ultravioleta (Sardella 2008, Pieters 2008).

Os bacilos apresentam agrupamento em forma de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como corda. O efeito fator corda é causado pela molécula contendo o ácido micólico, trealose 6,6-dimicolato (TDM), que compõe a parede celular das micobactérias, e está relacionado com importantes mecanismos imuno-moduladores responsáveis pela virulência das micobactérias. O fator corda auxilia, por meio de baciloscopia, na identificação do complexo *M. tuberculosis*, pois, em geral, outras micobacterias não tuberculosas apresentam fator corda negativo como *Mycobacterium avium* por exemplo. (Figura 1.1) (Simeão et al. 2009, Brasil 2008).

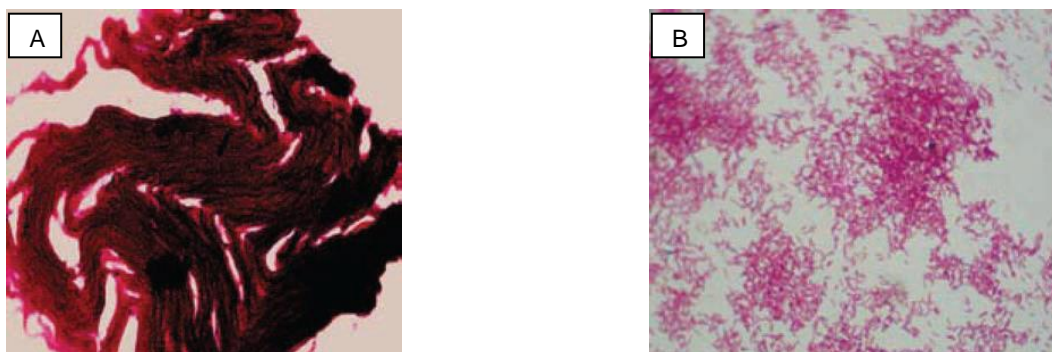


Figura 1.1 - Esfregaço de cultura obtida de meio sólido, corado por Ziehl Nielsen. A) Formação de fator corda de *M. tuberculosis*, B) aspecto corda negativo de *Mycobacterium avium*. Fonte: Brasil 2008.

1.1.3 Epidemiologia

A OMS estima que haja anualmente 1,5 milhões de mortes por TB e cerca de 390.000 mortes nos casos coinfetados TB/HIV. Países como China, Índia e Indonésia contribuíram com 45% de casos novos em 2015, mundialmente. Neste mesmo ano foram notificados 132.120 casos de tuberculose multidroga resistente ou resistente a rifampicina (MDR/ RR-TB) dos quais 124.990 com tratamento prévio (WHO 2016).

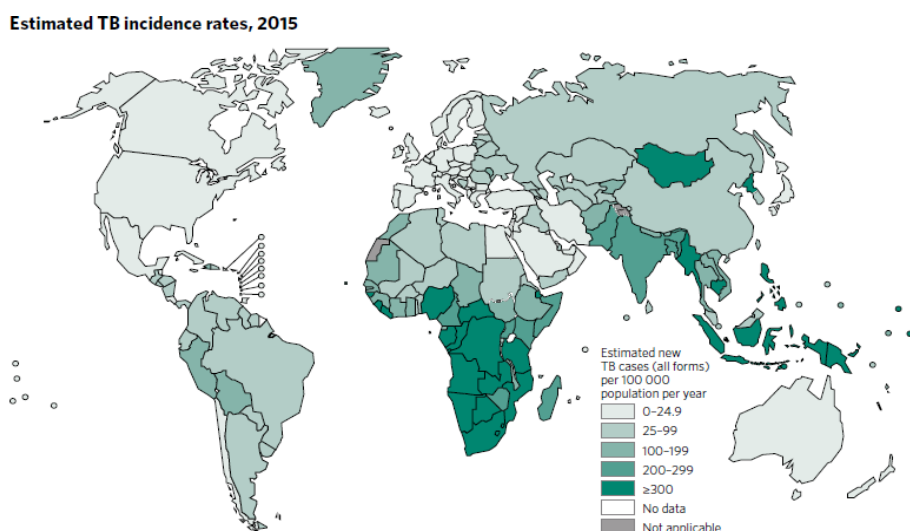


Figura 1.2 - Estimativa global de casos incidentes de tuberculose em 2015 (WHO 2016).

O Brasil está entre os 22 países com alto índice de TB, ocupando o 16º lugar, com cerca de 73 mil novos casos, taxa de incidência de 30,9/100.000 hab. e mortalidade de

2,2/100.000 hab, em 2015. As regiões de maiores coeficientes de incidência são: Norte (44,4/100.000 hab.), Sudeste (36,2/100.000 hab.) e Nordeste (31,6/100.000 hab) e entre os estados estão Amazonas (68,4), Rio de Janeiro (60,9), e Pernambuco (48,5). Já os maiores coeficientes de mortalidade ocorrerem no Rio de Janeiro (5,0 óbitos), Pernambuco (3,8) e Acre (3,6) por 100.000 habitantes, respectivamente. Entre as capitais Recife, Rio de Janeiro e Belém apresentaram maior risco de morte (WHO 2016, Brasil 2015). O coeficiente de incidência das capitais no ano de 2014 variou entre 7,9 a 99,3/100 mil habitantes em Palmas e Porto Alegre, respectivamente. Assim, dentre as 16 capitais que apresentaram os maiores índices de incidência, além de Porto Alegre, encontram-se Cuiabá, Recife, Manaus, Belém e Rio de Janeiro. Por outro lado, alguns estados como Acre (87,3%), São Paulo (82,8%) e Paraná (79,2%) atingiram maiores taxas de cura dos casos novos de TB pulmonar bacilífera em comparação com o indicador alcançado nacionalmente (72,5%). No entanto, Amazonas (15,9%), Rio Grande do Sul (15,1%) e Rondônia (14,0%) apresentaram taxas de abandono do tratamento dos casos de tuberculose pulmonar acima de 5%, considerado alto e portanto, não favorece ao controle da resistência as drogas e da TB (Brasil 2015).

1.1.4 Métodos diagnósticos

Embora os aspectos clínicos da TB possam ser imprecisos e inespecíficos, o diagnóstico da TB é primeiramente baseado na apresentação de sintomatologia clínica dos pacientes (Brasil 2008). Os métodos laboratoriais de diagnósticos mais empregados são baseados na identificação do bacilo proveniente de amostras biológicas, como o escarro, por métodos microbiológicos (baciloscopia e cultura), ou por métodos moleculares baseados na amplificação de ácidos nucléicos (FERRI 2014). Exames adicionais (radiológicos, imunológicos e bioquímicos) são importantes para auxiliar o diagnóstico (COURA 2005, FERRI 2014).

A baciloscopia é realizada do material biológico por observação direta do BAAR em esfregaço em lâmina e corado pela técnica de Ziehl-Neelsen. É uma técnica fácil e de baixo custo, amplamente utilizada tanto para o diagnóstico como para o controle do tratamento, porém com limitações para identificar os casos paucibacilares, apresentando sensibilidade reduzida e resultados falso-negativos (Brasil 2014). A cultura microbiológica é mais sensível, realizada de amostras clínicas através do cultivo de *M. tuberculosis* em meios específicos e, portanto, é o método diagnóstico “padrão de referência” para TB. O crescimento das colônias é utilizado para o teste de sensibilidade antimicrobiana o que

possibilita identificar a resistência a rifampicina e a outros tuberculostáticos. No entanto, a cultura é um método moroso e laborioso, pois o tempo de crescimento da bactéria é de 14 a 30 dias, impactando o diagnóstico laboratorial final (Brasil 2008, Brasil 2014).

O teste GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA), recomendado pela WHO e recentemente empregado no Sistema Único de Saúde do Brasil, é baseado na amplificação de ácidos nucleicos, sendo capaz de confirmar a presença de DNA de *M. tuberculosis* e a detecção rápida de resistência a rifampicina associada a mutações no gene *rpoB*. O ensaio é realizado diretamente de amostra clínicas pulmonares e não pulmonares com resultados em até duas horas. Todavia, apresenta algumas limitações como a necessidade de pessoal especializado e o elevado custo, além de não ser recomendado para monitorar o sucesso ou falha do tratamento (Zeka et al. 2011, Brasil 2014).

O teste cutâneo a tuberculina auxilia na triagem do diagnóstico da TB e identifica os casos LTBI, porém não discrimina da tuberculose ativa. Apesar de ser um dos métodos de diagnóstico mais antigo, apresenta importantes limitações como baixa especificidade em vacinados, recentemente, por BCG (bacilo de Calmette Guérin) ou em infectados por micobactérias não tuberculosas. O teste também pode apresentar baixa sensibilidade em alguns casos principalmente em imunocomprometidos. A necessidade de retorno do paciente, para leitura do teste 48 a 72 horas após aplicação, e interpretação variável do resultado dependente do leitor, também concorrem para seu uso limitado (Teixeira et al. 2007, Nijhawan et al. 2016).

O ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA) são ensaios *in vitro* utilizados na detecção da LTBI. É baseado na liberação de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico principalmente células T, estimuladas com antígenos específicos do complexo *M. tuberculosis*, e quantificado por ELISA. Tem como vantagem não apresentar reatividade cruzada com a vacina BCG e a maioria das micobactérias não-tuberculosa, além de precisar apenas de uma visita para realizar o teste. No entanto, são menos sensíveis em imunocomprometidos, como os infectados por HIV, além de não serem capazes de identificar a progressão da infecção para doença nos indivíduos diagnosticados com LTBI e de diferenciar infecção recente de remota, isto é, de infecções causadas por exposição á individuo bacilífero a mais de dois anos (WHO 2016, Diel et al. 2011).

Ensaio baseados na resposta imune humoral são extensivamente investigados devido ao seu potencial diagnóstico, ser de fácil operacionalidade, rápido, relativo baixo custo e usar espécime clínico de baixa a média invasividade, tais como soro ou plasma, saliva e líquido pleural. A sorologia baseada no método imunoenzimático é atraente, pois a infecção por *M. tuberculosis* induz no hospedeiro a produção de anticorpos (Ac) a uma variedade de antígenos micobacterianos (Martinez et al. 2007, Achkar, 2014). Entretanto, até o momento, nenhum dos testes disponíveis no mercado possui acurácia necessária ao seu uso na rotina diagnóstica.

1.1.5 Imunologia e patogênese da tuberculose

A TB é transmitida através da inalação de aerossóis contendo bacilos de *M. tuberculosis* expectorados por tosse, fala ou espirro de um indivíduo com infecção pulmonar, ou de vias aéreas superiores, ativa e bacilífero. Os bacilos inalados passam pelas primeiras barreiras físicas de defesa do organismo como cílios nasais, *clearance* mucociliar, morfologia das vias aéreas, onde ficam retidos impedindo a infecção. No entanto, alguns bacilos são capazes de ultrapassar estas barreiras naturais e, ao chegar aos alvéolos pulmonares, são fagocitados, principalmente por células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (MΦ) alveolares. Estas últimas células parecem ter um papel central na TB, pois, sabe-se que *M. tuberculosis* é capaz de sobreviver e se replicar no interior de fagossomas de MΦ não ativados. Mesmo assim, as células do sistema imune inato são importantes na resposta à infecção pelo bacilo de Koch, porque liberam citocinas gerando um processo inflamatório local e induzindo o recrutamento de mais células do sistema imune para o local de infecção (Teixeira et al. 2007, Marcos & Gomes 2013).

As células dendríticas sofrem processo de maturação, algumas são capazes de processar os bacilos, ou seus antígenos, migrando para os linfonodos regionais, e fazendo a apresentação de antígenos micobacterianos para linfócitos circulantes. Os linfócitos antígeno-específicos são ativados, iniciam o processo de proliferação clonal, e migram pela corrente sanguínea para o foco da infecção. Já no sítio infeccioso, células T específicas CD4+ atuam na liberação de citocinas e a CD8+ torna-se citotóxica. Entre as citocinas liberadas o IFN- γ é descrito ter papel central na imunopatogênese da TB (Teixeira et al. 2007). Esta citocina induz a ativação de macrófagos, potencializando suas atividades microbicidas, como indução da fusão dos lisossomas (contendo peptídeos tóxicos, pH ácido, intermediários reativos do oxigênio, nitrogênio e enzimas lisossômicas)

com fagossomas (albergando bacilos fagocitados, mas viáveis), gerando o fagolisossoma, onde *M. tuberculosis* pode ser mais facilmente eliminado. Porém, alguns bacilos também atuam interferindo na secreção das enzimas lisossômicas e na formação do fagossoma, além de, paralelamente, induzir a fusão do fagossoma com vesículas de onde capta nutrientes para a sua sobrevivência gerando um processo inflamatório local (Pieters 2008, Zhang. Qing 2012).

Dois subconjuntos de células T CD4+ desempenham papéis importantes na resposta celular inflamatória, as quais são classificadas em células Th1 e Th2 de acordo com as citocinas que secretam. Resposta do tipo Th1 (pró-inflamatória) é considerada mais eficaz no controle da infecção, induz a secreção de IFN- γ e interleucina (IL) 2 e IL3, entre outras, importantes para ativação de células fagocíticas que contribuem na contenção do crescimento bacteriano propiciando o controle da infecção. Atividade anti-inflamatória é atribuída a resposta das células Th2 sendo responsáveis pela produção de IL4, IL5, IL6 e IL10 que promovem a coalescência de granulomas, lise de células fagocíticas infectadas, liberação de enzimas lisossômicas, participação na formação de anticorpos e receptores de células B (Mayer & Hunt 2009, Agnaldo et al. 2006, Teixeira et al. 2007).

Além do IFN- γ , o fator de necrose tumoral (TNF) também é uma citocina pró-inflamatória importante para a formação e manutenção do granuloma. O granuloma é formado por uma bem organizada variedade de células do sistema imune, tais como linfócitos T e B, neutrófilos, fibroblastos, M Φ s infectados e não-infectados e células gigantes multinucleadas, formando uma barreira física que impede a saída dos bacilos, delimitando a infecção. Mas, em contrapartida também parece dificultar a entrada de linfócitos (Gupta, 2012, Duque-Correa et al. 2014). No granuloma os bacilos permanecem em meio com baixa oferta de oxigênio e nutrientes, o que contribui para diminuir a sua taxa de replicação, levando-os a um estado de latência, que é comum à aproximadamente 90% dos infectados por *M. tuberculosis*. Não obstante, pode haver falha na contenção do granuloma pelo sistema imune, e os bacilos podem reiniciar a replicação, forma-se um granuloma caseoso necrótico, levando a reativação endógena (Agnaldo et al. 2006, Sundararajan et al. 2012, Cousins et al. 2016).

1.1.6 Resposta de Células B e humoral

A imunidade humoral, mediada pelos linfócitos B, se caracteriza pela produção e secreção de anticorpos. Há alguns anos, o paradigma de que a imunidade humoral seria importante apenas para os patógenos extracelulares foi desafiado. Anticorpos são capazes de neutralizar ou até mesmo destruir os antígenos contra os quais foram gerados. Estudos recentes demonstraram que anticorpos específicos também podem auxiliar na proteção contra vários patógenos intracelulares, seja pelas vias clássicas de opsonização e ativação do sistema de complemento, bem como por sinalização através de receptores FcR, imunomodulação e interações com a resposta imune celular (Coelho-Castelo et al. 2009, Niki et al. 2015).

O reconhecimento de *M. tuberculosis* ocorre por meio de receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition patterns*, PRR). Foi descrito que o colesterol da membrana plasmática é também importante para ancoragem e entrada da bactéria na célula independente do receptor de padrão envolvido (Maglione & Chan 2009). Sabe-se que as respostas imune humoral são iniciadas pelo reconhecimento de polipeptídeos, polissacarídeos, lipídios ou outras macromoléculas pelo receptor de células B, IgM/IgD de membrana. Após o reconhecimento, a ativação dos linfócitos B pode ocorrer por células T dependente (antígenos proteicos) ou T independente (antígenos que não podem ser apresentados via MHC, como glicolipídios e polissacarídeos), seguindo-se de expansão clonal específica e diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos, ou em células B de memória (Abbas et al. 2006)

De acordo com as citocinas que as células B produzem, estas são divididas em linfócitos B efetores 1 (BE1) e 2 (BE2). O processo de diferenciação é influenciado pelo meio, onde interagem com antígenos, citocinas e células T. Ambientes com estimulação do perfil Th1 induzem o desenvolvimento de BE1 que são produtoras de IFN- γ , IL-12, TNF, IL-10 e IL-6; enquanto que quando sob influência da resposta Th2, são as BE2 que produzem IL-2, IL-4 e IL-13, bem como a IL-10 e IL-6. Do mesmo modo, linfócitos B também tem papel importante na modulação do perfil de resposta imune celular, influenciando no desenvolvimento de células T CD4⁺ *naive* em efectoras Th1 ou Th2 (Maglione & Chan 2009).

As citocinas produzidas por células tanto da resposta Th1 e Th2 também estimulam a proliferação e diferenciação de células B regulando a classe do anticorpo produzido, os quais ora favorecem a entrada do patógeno na célula ou sua eliminação através do sistema de complemento. Células B também têm diversas funções na resposta imunitária do hospedeiro, como: apresentar antígenos às células T via complexo principal

de histocompatibilidade de classe II (MHCII), produzir imunoglobulinas e citocinas, além de exercerem um efeito significativo na regulação de células T (Mayer & Hunt 2009, Abebe & Bjune 2009).

1.1.7 Imunoglobulinas

Anticorpos (Ac), gamaglobulinas ou imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas sintetizadas por linfócitos B ativados. Em humanos, existem cinco diferentes classes de Ig: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, as quais apresentam diferenças na estrutura da cadeia pesada e em suas funções efetoras e metabólicas. A classe de Ac predominante no soro é a IgG (corresponde à ~80% das proteínas do soro), cuja versatilidade permite realizar todas as funções das moléculas de imunoglobulinas. Possui quatro subclasses IgG 1, 2, 3 e 4, com base na ordem decrescente das concentrações séricas encontradas. Apesar de apresentarem ~ 90% de similaridade em sua sequência de aminoácidos, as diferenças são suficientes para lhes conferir singularidades em relação a ligação antígeno-anticorpo, meia vida, transporte placentário, ativação do complemento e células efetoras (Silva 2012, Vidarsson et al. 2014)

Interações entre células B e T auxiliares são importantes para a resposta humoral eficaz, e alguns estudos indicam que determinadas citocinas influenciam a expressão dos subtipos produzidos por células B. O padrão de citocinas Th1 induz predominantemente a subclasse IgG1, ao passo que, em perfil Th2 o subtipo mais prevalente é IgG2. Além de citocinas, outros fatores como a natureza do antígeno, também pode influenciar o tipo de subclasse induzida. Antígenos proteicos solúveis e proteínas de membrana seriam indutores, principalmente, de IgG1 e níveis reduzidos de IgG3 e IgG4. Já respostas humoral a antígenos polissacarídeos apresentam predominância de IgG2, e sua deficiência, juntamente com a diminuição do isotipo IgG4, está relacionado a susceptibilidade as infecções bacterianas (Snapper et al. 1997, Sousa et al. 1998, Vidarsson et al. 2014). As subclasses são produzidas, naturalmente, em diferentes concentrações no soro, todavia antígenos secretados por bactérias são reconhecidos pelo sistema imune, elevando de forma seletiva uma determinada subclasse de anticorpos para os antígenos a fim de auxiliar no combate a infecção (Snapper & Mond 1993, Maglione & Chan 2009).

Anticorpos podem auxiliar na contenção da disseminação bacilar, seja pela opsonização do bacilo, por modulações pró- ou anti- inflamatórias ativadas por FcR, ou através de interações com a imunidade mediada por células (Achkar et al. 2015). Assim, a

produção de subclasses de IgG contra Ags micobacterianos poderia ser modulada durante a manutenção da infecção latente. A permanência de *M. tuberculosis* no hospedeiro requer a modulação da expressão de diferentes moléculas, que podem ser reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro, para se adaptar às condições limitantes do granuloma (Albrethsen & Agner 2013). Logo, antígenos que são ativamente secretados durante a fase de replicação bacilar, como ESAT6, CFP10 e PstS1, provavelmente teriam um papel menos dominante na infecção latente. Estudos recentes sugerem que um Grupo de genes, descritos como LAA (Do inglês - “*latency-associated antigens*”), são altamente expressos durante a latência de *M. tuberculosis* (Singh et al. 2014) tais como os antígenos Rv2029c, Rv2031e Rv2628 (Wisedchaisri et al. 2007).

1.1.8 Antígenos:

Os antígenos ESAT-6 (Do inglês - “*6 kDa early secretory antigenic target*”) e CFP10 (Do inglês - “*culture filtrate protein 10*”), ambos localizados na região de diferença 1 (RD1) do genoma de *M. tuberculosis*, portanto ausentes nas cepas de *M. bovis BCG*, e na maioria das espécies de micobactérias atípicas o que evita reatividade cruzada em vacinados por BCG e expostos a outras micobactérias não tuberculose. Estas proteínas são reconhecidas por ambas as respostas imune, celular e humoral, com boa sensibilidade em teste diagnóstico, principalmente em populações de áreas não endêmicas para TB (Mattos et al. 2010). Estudos nacionais mostram que estes antígenos são fortemente reconhecidos estimulando a produção de INF- γ em aproximadamente 73% dos pacientes com TB (Tavares et al. 2007). São marcadores de testes comerciais, QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) e T-SPOT TB, formulados para detecção de INF- γ . No entanto, apresentam limitações para diferenciar entre infecção e a doença ativa (Mattos et al. 2010, Diel et al. 2011).

A proteína 38kDa é uma lipoproteína transportadora de fosfato periplasmático 1 (PstS1) caracterizada como uma glicoproteína de adesão da família de transportadores de fosfato ABC, interage com os receptores de manose de macrófagos e indução da fagocitose. Adicionalmente, foi descrita redução na replicação de *M. tuberculosis* após o rompimento do gene que codifica o PstS1, sugerindo ser um fator de virulência. É altamente imunogênica por induzir repostas Th1 e de anticorpos (Peirs et al. 2005, Esparza et al. 2015). Seu potencial diagnóstico na LTBI foi testada para detecção de IFN- γ , usando como marcador uma construção contendo peptídeos da proteína, fusionados ao

CFP10 (PstS-1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10), demonstrando sensibilidade e especificidade similares ao internacionalmente utilizado ESAT-6:CFP-10 (Araujo et al. 2014).

Um grupo de genes foi descrito como associados a latência, pois são altamente expressos na adaptação a hipóxia e a baixas concentrações de óxido nítrico e pH. Ensaio *in vivo* e *in vitro* indicam que o gene *DosR* (Do inglês “dormancy survival regulon”) é o regulador principal durante a latência de *M. tuberculosis* (Roberts et al. 2004, Singh et al. 2014). Durante as condições limitantes da fase de latência *DosR* ativa a transcrição de 48 genes importantes para sobrevivência do bacilo e sua persistência na fase de infecção latente (Roupie et al. 2007, Bai et al. 2016). Dentre estes estão os antígenos Rv2029c, Rv2031c e Rv2628 e *ArsR* (Rv2034), e genes hipotéticos hiperexpressos em condições de hipóxia na fase de latência tais como o Rv3353 (Roberts et al. 2004).

O antígeno 16-kDa alfa-cristalina (Rv2031c, *hspX*) é codificado por *acr*, é descrito como fortemente imunogênico para células T e B e indutor de produção de anticorpos. É reconhecido por Ac em cerca de 70% dos pacientes com TB com baciloscopia positiva e 50% com baciloscopia negativa, assim como em indivíduos LTBI (Roupie et al. 2007). Em estudos de resposta imune mediada por células em população exposta ao *M. tuberculosis*, predominância de resposta protetora induzida por 16 kDa foi detectada entre os infectados, enquanto os que poderiam progredir para doença ativa, apresentaram resposta de IFN- γ direcionada ao ESAT-6/CFP-10. Outro antígeno associado a latência é Rv2628 que foi descrito estimular forte resposta em indivíduos infectados remotamente, mostrando-se capaz de distinguir infecção recente de remota, sugerindo estar associada a proteção contra tuberculose (Goletti et al. 2010).

O antígeno codificado pelo gene *rv2029c* (*pfkB*) mostra-se mais reconhecido por células T com maior produção de INF- γ por indivíduos infectados do que pacientes com TB (passada ou ativa), os quais reconhecem preferencialmente os Ags CFP-10 e ESAT-6 (Leyten et al. 2007).

O gene regulador da família *ArsR* *rv2034* é caracterizado como um regulador transcricional envolvido no metabolismo lipídico e resposta hipóxica em *M. tuberculosis*. Foi demonstrado que o *Rv2034* é capaz de se ligar com a região promotora de DNA de *DosR* e regular positivamente a sua expressão (Gao et al. 2012). O gene *rv3353c*, codifica uma proteína hipotética, é descrito apresentar expressão aumentada em condições de hipóxia, no entanto, são escassos os estudos de caracterização imunológica

para esta proteína até o momento (Griffin et al. 2011). Embora já se tenha observado alta reatividade de IgG1 após início do tratamento, para dos antígenos Rv3353, Rv2628, Rv0867, sugerindo ser um potencial biomarcador da eficácia do tratamento (Mattos et al. 2010), pouco se conhece sobre a relevância dos subtipos de imunoglobulinas induzidos pela maioria destes antígenos na LTBI.

1.2 Justificativa

A TB é um grave problema de saúde pública, atingindo principalmente países em desenvolvimento, onde a pobreza, as más condições de vida e do estado nutricional, bem como o deficitário acesso aos serviços de saúde, favorece a transmissão do bacilo. No entanto, mesmo em locais onde estas condições são menos estridentes a tuberculose ainda continua a se constituir em um problema grave de saúde pública, principalmente associada a doenças imunossupressora como a causada pelo HIV. A TB por ser de transmissão aérea pessoa a pessoa, o diagnóstico e tratamento precoce dos doentes, bem como a identificação e tratamento preventivo dos infectados em maior risco de desenvolver a TB ativa, e o desenvolvimento de vacinas são estratégias importantes para o controle da TB.

Estudos que viabilizem uma melhor compreensão da resposta imune humoral e celular, aos antígenos micobacterianos que são constitutivamente expressos pelo bacilo ou àqueles exclusivamente secretados durante a infecção latente são relevantes. Assim, o estudo de subclasses de IgG pode fornecer subsídios não só para o diagnóstico da TB/infecção, mas oferece oportunidade de conhecer melhor a dinâmica da resposta imune humoral por subclasses de IG a diferentes antígenos associados a diferentes fases da infecção/ doença em nossa população.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a imunoreatividade de subclasses de IgG, na TB ativa/infecção, a um painel de antígenos micobacterianos associados à fase de latência (Rv2031c, Rv2628, Rv2034 e Rv2029c) ou à ambas as formas de infecção (ESAT6:CFP10, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e Rv3353) em pacientes com TB e contatos recentes de pacientes com Tb ativa, cujos resultados de resposta imune celular por IFN- γ já são conhecidos ao mesmo painel de antígenos.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 – Avaliar a imunoreatividade dos subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4
- 2 – Estimar a sensibilidade e especificidade dos testes.
- 3 – Correlacionar a imunoreatividade humoral e resposta imune celular por IFN- γ ,
- 4 – Correlacionar a imunoreatividade humoral com as características clínicas e demográficas da população de estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Considerações Éticas*

O estudo foi realizado em conformidade com os padrões atuais de saúde e de acordo com as recomendações do comitê de ética. O sangue dos pacientes foi, previamente, coletado após consentimento formal, livre e esclarecido antes do início de qualquer procedimento. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Fundação Oswaldo Cruz (Nº 560-10).

3.2. *Tipo e Desenho do Estudo:*

Estudo observacional e transversal de avaliação da imunoreatividade de subclasses de IgG contra antígenos micobacterianos associados apenas à fase de latência (*latency-associated antigens*, LAA) ou a ambas as formas de infecção por *M. tuberculosis*, em plasma de contatos recentes de pacientes com TB ativa (rCt) e de pacientes com TB.

Os plasmas, previamente obtidos para a tese de doutorado defendida no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, intitulada "*Avaliação de biomarcadores de infecção por Mycobacterium tuberculosis via resposta celular e de transcrição gênica em coorte prospectiva de contatos recentes de pacientes com tuberculose ativa*" (Araujo et al, 2015) e para a dissertação de mestrado defendida no Programa de Pós Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), intitulada "*Avaliação da resposta imune celular a antígenos micobacterianos em pacientes com tuberculose coinfectados com parasitos intestinais*" (Silva, 2014), foram mantidos a -80°C no Laboratório de Microbiologia Celular até o uso.

Os indivíduos foram arrolados, nestes estudos prévios, em colaboração com o programa de controle da Tuberculose do Ambulatório de Tisiologia, do Instituto de Doenças do Tórax (IDT) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, coordenado pela Dra. Fernanda Carvalho Queiroz Mello, Diretora do IDT/HUCFF/UFRJ. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL)/IOC/Fiocruz.

3.3. Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo plasmas de participantes com TB ativa e rCt de ambos os sexos, sem patologias imunossupressoras, mulheres que não estivessem em período gestacional, com idade ≥ 18 anos e sorologia negativa para HIV, diagnosticados de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde (Brasil 2011) e pela Organização Mundial de Saúde (WHO 2013) e que tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.4. População de estudo:

Todos de exames de rotina para detecção ou exclusão de TB ativa, além de entrevista para obter informações de dados sociais, epidemiológicos e demográficos, foram realizados no IDT. As coletas de sangue não fizeram parte da rotina e foram, portanto, realizadas exclusivamente para os estudos prévios supracitados.

3.4.1. Pacientes com Tuberculose:

As amostras de pacientes com TB ativa foram coletadas, no período de 2011-2014, para a dissertação de mestrado de Renan Jeremias da Silva. Para definição e triagem dos casos de TB critérios clínicos, radiológicos (Raio-X) e/ou microbiológicos foram utilizados. Os pacientes tiveram o escarro coletado para bacterioscopia por coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) e para cultura em meio sólido de Lowenstein Jansen (LJ). A identificação de *M. tuberculosis* foi realizada por testes bioquímicos no Laboratório de Micobacteriologia e bioensaios do Instituto Nacional de Infectologia (INI), FIOCRUZ. Estavam disponíveis, em quantidade suficiente para realização do presente estudo, 24 amostras de plasmas de pacientes assim diagnosticados para TB, os quais constituíram os participantes do Grupo 4 (Figura 3.1).

3.4.2. Contatos recentes de pacientes com TB (rCt)

As amostras de rCt foram obtidas no período de 2011-2015 durante o doutoramento de Leonardo Silva de Araujo, onde foram definidos e triados como descrito a seguir:

- Triagem de rCt por teste cutâneo à tuberculina (TCT) e ensaio de liberação de interferon gama (IGRA): Após a exclusão de TB ativa nos rCt, utilizando os mesmos critérios acima, estes foram submetidos ao TCT, pela técnica de Mantoux. Resumidamente, foi administrado, por via intradérmica, 5 UI de tuberculina RT23 (Statens Serum Institut, Copenhagem, Dinamarca), e os resultados foram lidos após 72hs pelo mesmo integrante do corpo de enfermagem do HUCFF. Os participantes que apresentaram induração ≥ 5 mm foram considerados TCT+, ou seja LTBI, e lhes foram oferecidos tratamento profilático gratuito com isoniazida (IPT). Os rCt que apresentaram TCT < 5 mm, foram considerados não-infectados. Assim, para o presente estudo estavam disponíveis 91 plasmas de participantes investigados para rCt, dos quais 53 eram TCT⁺ e 38 TCT⁻. Considerando que a resposta imune celular por produção de IFN- γ já estava disponível, os rCt foram também classificados de acordo com os resultados dos ensaios de IGRA de longo tempo (5 dias) de estimulação (LSA) das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) com o antígeno usado internacionalmente, ESAT-6:CFP-10, (Araújo et al, 2015). Plasmas estavam disponíveis para 36 (39.6%) participantes com LSA-ESAT6:CFP10⁺ e 55 (60.4%) com LSA-ESAT6:CFP10⁻.

Portanto, considerando ambos os resultados baseados na resposta imune celular, no presente estudo foram incluídos plasmas de participantes assim agrupados: 25 e 24 plasmas de participantes com TCT e IGRA concordantemente negativos (Grupo1 ou controle: TCT/LSA-ESAT6:CFP10⁻) e positivos (Grupo 2 ou LTBI: TCT/LSA-ESAT6:CFP10⁺), respectivamente, e 42 participantes com TCT e IGRA discordantes (Grupo 3 ou provável LTBI: TCT⁻/LSA-ESAT6:CFP10⁺ e TCT⁺/LSA-ESAT6:CFP10⁻) (Figura-3.1).

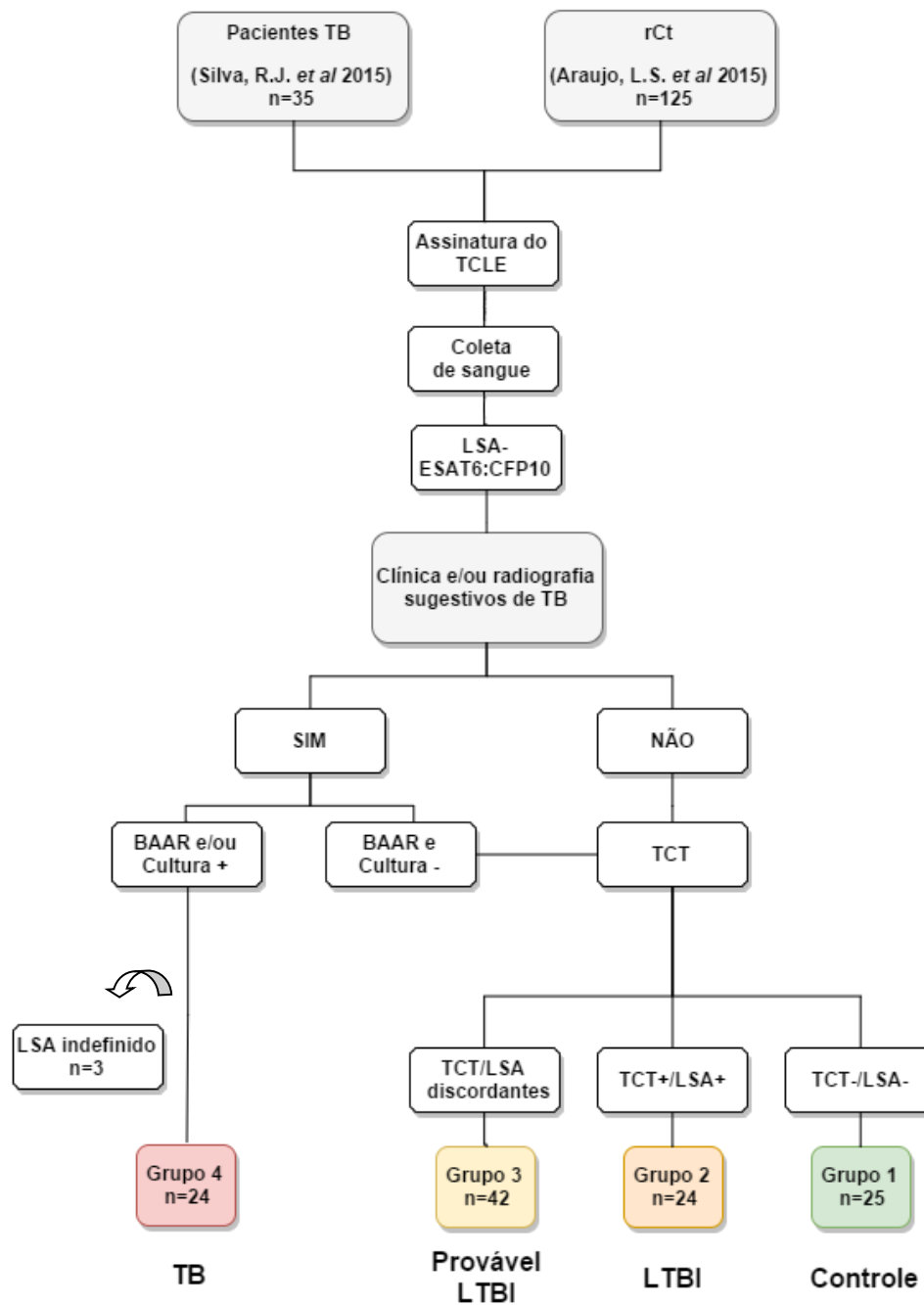


Figura-3.1 Fluxograma da população estudada de rCt e TB, arrolada previamente de acordo com Araújo et al, 2015 e Silva et al, 2014.

TCT: Teste cutâneo Tuberculínico, LSA - Ensaio de liberação de IFN- γ após longa (5 dias) estimulação das PBMC com os antígenos ESAT-6:CFP-10. TB: Tuberculose. rCt: contatos próximos e recentes de TB.

3.5. Ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA) após longa estimulação (long-term stimulation assay, LSA)

Previamente, para o LSA, 20mL de sangue periférico foram colhidos em tubos heparinizados (Vacuette, Greiner bio-One, Brasil). A extração das PBMC foi realizada seguindo-se o protocolo de Araujo et al. 2014. Resumidamente, as células foram separadas através de centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) por 30 minutos, 913xg, à 25 °C. Seguido de duas lavagens com RPMI 1640 (LGC, Biotecnologia, Brasil), à temperatura ambiente. Em seguida, as PBMC foram ressuspendidas com 2 mL de meio RPMI suplementado com 20% de plasma autólogo e 120 μ L de PEES (penicilina + estreptomicina) (LGC Biotecnologia, Brasil). As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer (Optik Labor, UK), utilizando-se de microscopia óptica, onde as não viáveis eram coradas pelo corante azul de trypan e portanto excluídas da contagem (HyClone®, South HyClone Road Logan, Utah) (Tavares et al. 2007). As PBMC quantificadas foram diluídas a 10⁵ e primadas em triplicata, com ou sem os estímulos selecionados (Rv2031c, Rv2628, Rv2034, Rv2029c, RV3353, ESAT6:CFP10, PstS-1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10) e Con-A, em microplacas de 96 poços com volume final de 300 μ L. Os cultivos foram feitos por 5 dias em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação e centrifugação das placas, os sobrenadantes foram estocados em microtubos a -20°C até a hora do uso.

3.6. Dosagem de interferon-gamma nos sobrenadantes de cultura.

A dosagem de INF- γ foi previamente realizado utilizando o kit comercial baseado no ensaio imunoenzimático (ELISA) (DuoSet® kit, R&D Systems, Miniapolis, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados obtidos dos sobrenadantes de cultura pós estimulação com os antígenos foram subtraídos dos valores dos sobrenadantes de cultura, isto é, células sem estímulo, e foram expressos em pg/mL com *cut off* estabelecido de 100pg/ml (Araujo et al. 2014) para todos os antígenos testados.

3.7. Dosagem de subclasses de IgG por ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)

A padronização do ELISA e os ensaios de detecção de isotipos de IgG nos plasmas foram desenvolvidos, neste estudo, de acordo com Harrington III *et al.* (2000), com pequenas modificações. As placas de fundo chato (Nunc, flat Botton imunoplate C96 Maxisorp, Thomas Sci, USA) foram sensibilizadas com 50µL de cada antígeno em três diferentes concentrações (0.5, 1 ou 2µg/mL) diluído em tampão carbonato–bicarbonato pH9,6 (NaHCO₃ 15mM; Na₂CO₃ 15mM). Em seguida as placas foram incubadas em câmara úmida à 37°C, por 2 horas e posteriormente lavadas, por 3 vezes seguidas, com 200µL de tampão fosfato-salino (PBS, NaCl 9,92mM, Na₂HPO₄ 90mM; NaH₂PO₄ 18,98mM; pH7,4) adicionado de 0,05% de tween 20 (PBST). Foi então realizada a etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação dos poços das placas adicionando-se 100µL do tampão de bloqueio (PBST 0.01% + 5% de soroalbumina bovina-BSA) e incubadas a 37°C em câmara úmida por duas horas. Seguindo-se a nova etapa de lavagem, foram adicionados 50µL do pool de plasma de contatos com TCT+ ou TCT- diluídos nas concentrações 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ou 1:40 e incubadas durante 1:30h. Após lavagem, foram adicionados 50µL de IgG de camundongo anti-IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano (Invitrogen - MA, USA) conjugado a peroxidase nas diluições 1:200, 1:300, 1:400, 1:600 e 1:800 nos respectivos poços. As placas foram novamente incubadas e após lavagem seguiram-se as etapas de revelação por adição de 50µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, USA), incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e adição de 50µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5N, para parar a reação. A leitura das absorvâncias foi realizada com filtro de 450nm em leitor de microplacas (BioTek Instruments U.S.A).

Após padronização das variáveis, Ag, Ac e conjugados, todos os testes de avaliação dos plasmas, individualmente, foram realizados em duplicata. Pool de plasmas de indivíduos com TCT⁺ e TCT⁻, respectivamente, foram adicionados as placas dos diferentes testes para controle de variabilidade entre os diferentes experimentos. Em todas as placas poços sem amostra clínica (*blank*) foram incluídos para correção de *background* da reação.

3.8. Antígenos

Os antígenos recombinantes de *M. tuberculosis* ESAT6, CFP10 e PstS1 associados à infecção ou os associados à latência Rv2031c, Rv2628, Rv2034, Rv2029c e Rv3353, produzidos em *Escherichia coli*, foram gentilmente doados pelo Dr Mahavir Singh do Helmholtz Centre for Infection Research, Germany ou por Dr Tom Ottenhoff da Leiden University Medical Centre, The Netherlands, respectivamente. A construção, purificação e expressão da quimera proteica PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foram realizadas no LAMICEL (Araujo et al. 2014).

3.9. Análises dos resultados

Os dados coletados dos estudos anteriores foram utilizados para confecção de banco de dados em software Excel, onde foram também inseridos os D.Os obtidos nos ensaios sorológicos neste estudo e os resultados de IFN- γ , obtidos previamente. Para as análises estatísticas e confecção de gráficos foram utilizados o SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) e GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.CA, USA) para as características clínicas demográficas e epidemiológicas, definição de cut off e sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA. Foram utilizados testes não-paramétricos para comparações entre mais de dois Grupos (Kruskal-Wallis) com correção de Dunn. Valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Teste de correlação de Spearman bi-caldal foi utilizado para avaliar as taxas de correlação entre as dosagens das diferentes subclasses de IgG (1, 2, 3, e 4) e os níveis de IFN- γ obtidos nos ensaios de IGRA. As intensidades dos valores de correlação de Spearman $< 0,3$ foram considerados como fracos, entre $0,3 - 0,6$ moderados, e $> 0,6$ fortes.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas e demográficas

Na tabela 4.1 estão sumarizados os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos 91 participantes deste estudo. A maioria é do sexo feminino (60/91, 65,9%; $p=0,001$), com cicatriz vacinal da BCG (65/91, 71,4%) e contatos de caso índice (CI) bacilífero, isto é, de pacientes TB com baciloscopia (62/91, 68,1%) e/ou cultura (77/91, 84,6%) positivas. Alterações na imagem do raio-X de tórax foi evidenciada em 13/91 (14,3%). Participantes profissional da área de saúde contou com 11/91 (12,1%). O TCT e o LSA-ESAT6:CFP10 positivos foi evidenciado em 58% e 39,6% dos participantes, respectivamente.

Tabela 4.1 – Características clínicas e demográficas dos 91 indivíduos contatos recentes (rCt) incluídos no estudo.

Características dos rCt (média± DP)		Número	%
Idade	(41,1 ± 14,1)	91	100
Gênero			
	Masculino	31	34,1
	Feminino	60*	65,9
Histórico de TB Passada		4	4,3
Tabagismo		23	25,2
Co-morbidades		34	37,3
Grau de contato			
	Intradomiciliar	44	48,4
	Extradomiciliar	47	51,6
Cicatriz da vacinação com Bacilo Calmette-Guérin		65	71,4
TCT (cutoff=5mm)			
	Positivo (12 ± 4.8mm)	53	58,2
	Negativo (3.± 1.0mm)	38	41,8
LSA-ESAT6:CFP10 (cutoff=100pg/mL)			

	Positivo (464 ± 473.9)	36	39,6
	Negativo (13 ± 20.7)	55	60,4
Imagem Raio-X de tórax com alterações		13	14,3
Profissionais da área da saúde		11	12,1
Caso índice (n de rCt)			
Cultura	Negativo	6	6,6
	Positivo	77	84,6
	Não realizado	8	8,8
Baciloscopia	Negativo	22	24,2
	Positivo 1+	45	49,5
	Positivo ≥2+	17	18,7
	Não realizado	7	7,6

*p=0,001

A maioria dos pacientes com TB era da forma clínica pulmonar (20/24, 83,3%), sem história de TB no passado (87%), não tratados (14/24, 58%), sendo a metade com baciloscopia negativa (12/24, 50%). Não houve diferença significativa na média de idade entre TB (41,2 anos, DP = 14,3) e rCt (41,1, DP = 14,1, p=0,73) porém, a maioria dos casos de TB é do sexo masculino (rCt = 34,1%, TB = 58,3%, p= 0,036), e sem diferença dentro do Grupo TB (p=0,37). O hábito de tabagismo foi informado por 29,1% dos pacientes (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Dados clínicos e epidemiológicos dos 24 pacientes TB incluídos no estudo.

Características (média± SD)		Número	%
Idade (anos)	(41,2 ± 14,3)	24	100
Gênero	Masculino	14	58,3
	Feminino	10	41,7
	Histórico de TB	3	12,5
Tabagismo		7	29,1
Sítio da infecção	Pulmonar	20	83,3

	Extrapulmonar	4	16,7
LSA-ESAT6:CFP10 (cutoff=100pg/mL)			
	Positivo (508,0 ± 493,6)	15	62,5
	Negativo (71,0 ± 16,5)	6	25
	Não realizado	3	12,5
Tempo de tratamento da TB			
	Não tratado	14	58,3
	< 3 meses	4	16,7
	> 3 meses	5	20,8
	Não informado	1	4,2
Baciloscopia			
	Negativo	12	50,0
	Positivo 1+	3	12,5
	Positivo ≥2+	3	12,5
	Sem informação	6	25,0

4.2. Resposta humoral por subclasses de IgG.

Padronização: Para as padronizações dos testes, dois diferentes *pools* de rCt foram utilizados: (i) TCT⁺ e (ii) TCT⁻. Os espécimes clínicos, antígenos e conjugados (anti-IgG1, 2, 3 ou 4) foram testados em diferentes concentrações a fim de otimizar a diferenciação entre os *pools* ensaiados. A padronização de IgG4 não apresentou reatividade satisfatória, pois os valores de densidade óptica (DO) foram baixos e sem discriminação significativa entre os *pools*, logo, não prosseguimos com os testes para esta subclasse de IgG. A tabela 4.3 apresenta as concentrações de antígeno e fatores de diluição de anticorpo secundário (conjugado) e de espécime clínico que foram utilizados para os ensaios com os plasmas individualmente.

Tabela 4.3 – Resultados das padronizações de ELISA com os pools de indivíduos contatos recentes de pacientes com tuberculose com teste cutâneo a tuberculina positivo e negativo, respectivamente.

Antígenos ¹	Fator de Diluição					
	IgG1		IgG2		IgG3	
	Conjugado	Plasma	Conjugado	Plasma	Conjugado	Plasma
Rv2029c				1:8	1:300	1:16
Rv2031c				1:16	1:400	1:8
Rv2034		1:4		1:16	1:300	1:16
Rv2628	1:800		1:600	1:16	1:200	1:8
Rv3353				1:8	1:200	
ESAT6/CFP10		1:2		1:16	1:400	
PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10		1:8		1:4	1:400	

¹ concentração de 1 µg/mL, exceto PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 com 0.5 µg/mL

4.3. Imunoreatividade de Subclasses de IgG a diferentes antígenos micobacterianos.

Como mostrado na Figura 4.1, foram encontradas diferenças significativas de reatividade média de IgG1, entre o Grupo IV (TB) e todos os demais Grupos de rCt, para todos os antígenos, com exceção do Rv2031c. A proteína fusionada PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foi a única a mostrar diferença significativa entre as reatividades médias de IgG1 em LTBI (Grupo II) vs controle (Grupo I), embora sem diferença entre Grupo IV vs II.

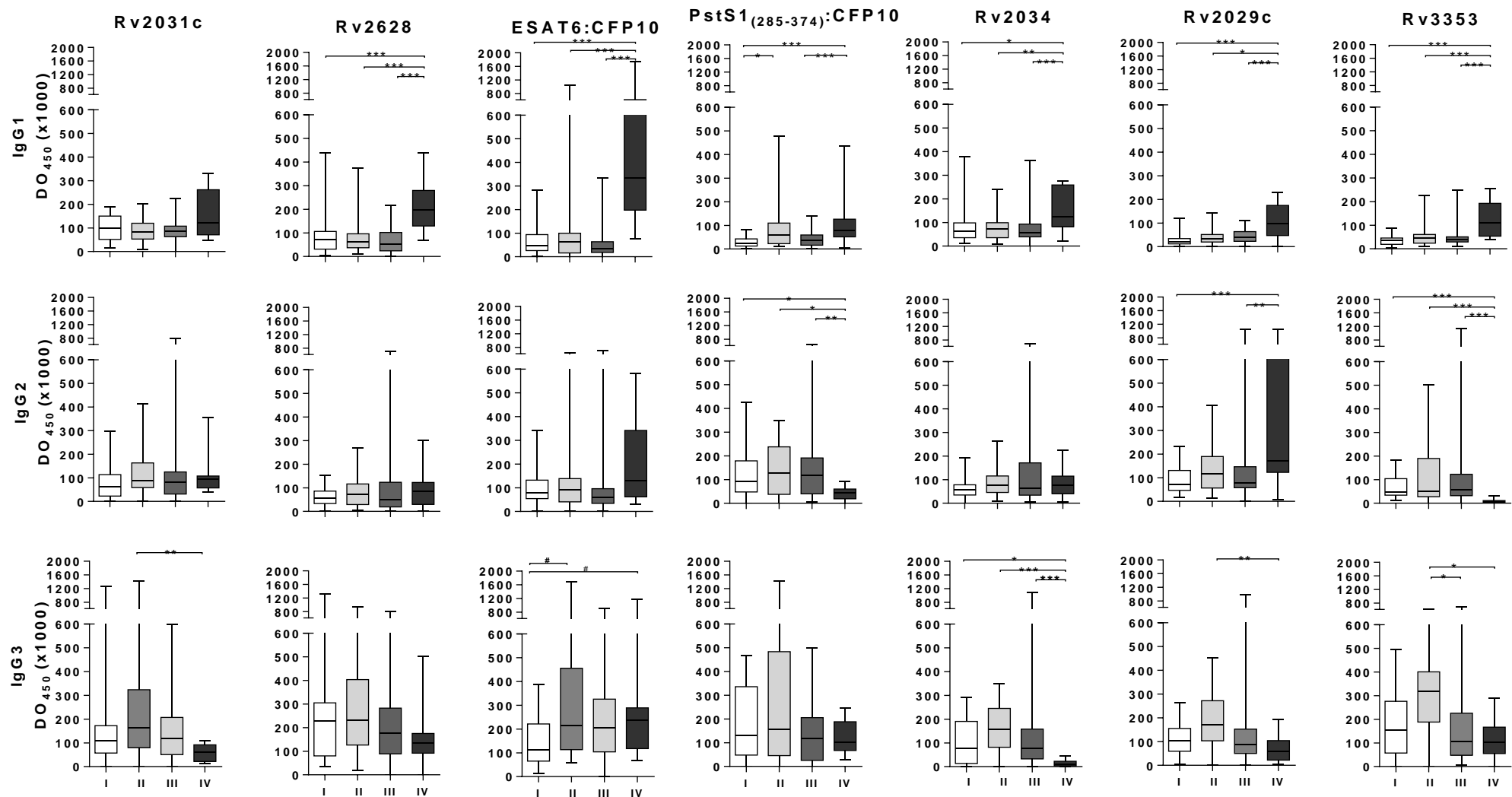


Figura 4.1 – Resposta imune humoral, expressa em mediana e intervalo interquartil, por isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 à um painel de antígenos micobacterianos (Rv2031c, Rv2628, ESAT6:CFP10, PstS1(285-374):CFP10, Rv2034, Rv2029c, Rv3353) em amostras de plasma de indivíduos saudáveis contatos recentes de pacientes com tuberculose (TB) agrupados pela resposta ao teste cutâneo a tuberculina (TCT) e de liberação de interferon-gama (IGRA): Grupo I= TCT/IGRA⁻ (n=25), Grupo II= TCT/IGRA⁺ (n=24), Grupo III= discordantes ao TCT/IGRA (n=42) e Grupo IV= TB (n=24). *p*-valor *<0.05, ** <0.01 e *** <0.001, # 0.07

Legenda Figura 4.1 com os valores de mediana e intervalo interquartil para as diferentes subclasses de IgG.

IgG1 - (**Rv2031**: Grupo I – 100 [51-150], Grupo II – 88 [62-108], Grupo III 83 [52-119], Grupo IV- 120 [71-262]. **Rv2628**: Grupo I – 71 [31-106], Grupo II – 53[24-102], Grupo III – 63 [37-96], Grupo IV – 197 [129-279]. **ESAT6:CFP10**: Grupo I – 47 [26-94], Grupo II - 63 [16-100], Grupo III – 32 [18-64], Grupo IV – 334 [197-618]. **PstS1**₍₂₈₅₋₃₇₄₎:**CFP10**: Grupo I – 25 [12-42], Grupo II – 59 [23-109], Grupo III 35 [16-59], Grupo IV – 78 [51-126]. **Rv2034**: Grupo I – 64 [35-98], Grupo II – 74 [36-99], Grupo III – 57 [39-93], Grupo IV – 124 [82-259]. **Rv2029**: Grupo I – 12 [0-20], Grupo II – 41 [23-64], Grupo III – 35 [19-51], Grupo IV – 98 [47-174]. **Rv3353**: Grupo I – 36 [19-45], Grupo II – 44 [24-61], Grupo III – 38 [29-50], Grupo V – 110 [194-93]).

IgG2 - (**Rv2031**: Grupo I – 60 [15-112], Grupo II – 87 [60-154], Grupo III – 90 [31-158], Grupo IV – 98 [59-145]; **Rv2628**: Grupo I – 56 [34-84], Grupo II – 63 [27-106], Grupo III – 46 [19-118], Grupo IV – 91 [56-124]; **ESAT6:CFP10**: Grupo I – 75 [54-128], Grupo II – 79 [43-132], Grupo III – 61 [34-115], Grupo – IV 116 [62-342]; **PstS1**₍₂₈₅₋₃₇₄₎:**CFP10**: Grupo I – 92 [48-179], Grupo II-127[35-215], Grupo III – 116[41-190], Grupo IV – 44 [35-56]; **Rv2034**: Grupo I – 63 [36=84], Grupo II – 74 [41-107], Grupo III – 62 [31-169], Grupo IV – 67 [30-91]; **Rv2029c**: Grupo I – 72 [43=131], Grupo II – 101 [54-186], Grupo III – 79 [58-153], Grupo IV – 201 [123-364]; **Rv3353**: Grupo I – 46 [33-103], Grupo II – 62 [8-158], Grupo III – 57 [32-152], Grupo IV – 7 [0.5-16]).

IgG3 - (**Rv2031**: Grupo I – 111 [59-169], Grupo II – 158 [67-324], Grupo III – 120 [48-213], Grupo IV – 70 [34-87]; **Rv2628**: Grupo I – 215 [81-295], Grupo II – 231 [119-404], Grupo III – 175 [84-173], Grupo IV – 140 [97-206]; **ESAT6:CFP10**: Grupo I – 120 [66 - 117], Grupo II – 196 [111-426], Grupo III – 206 [107-326], Grupo IV – 236 [128-297]; **PstS1**₍₂₈₅₋₃₇₄₎:**CFP10**: Grupo I – 52 [147-336], Grupo II 143 [37-408], Grupo III – 119 [24-194], Grupo IV – 126 [88-179]; **Rv2034**: Grupo I –77 [13-190], Grupo II – 157 [77-252], Grupo III – 79 [35-178], Grupo IV – 19 [9-24]; **Rv2029**: Grupo I – 102[59-155], Grupo II – 171 [98-281], Grupo III – 91 [50-168], Grupo IV – 71 [25-119]; **Rv3353**: Grupo I – 142 [58-261], Grupo II – 319 [168-419], Grupo III – 106 [49-236], Grupo IV – 116 [74-11]).

Nas análises de curva ROC (Receiving Operating Characteristic) foram fixadas as especificidades entre 90% a 92% para todos os ensaios de subtipos de IgG, comparando os valores de D.O dos Grupos I vs II ou IV, isto é controle (TCT/LSA-ESAT6:CFP10⁻) vs LTBI (TCT/LSA-ESAT6:CFP10⁺) ou TB, respectivamente (Tabela 4.4, 4.5 e 4.6).

Para detecção de LTBI (Grupo II) vs Grupo I, as maiores AUROC (area under the roc curve) e sensibilidade (48%) foram observadas para os ensaios IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 (AUROC = 0,74; IC95% = 0,59 - 0,88), os demais ensaios apresentaram menores AUROC (<0,69) e sensibilidade (≤26%, Tabela 4.4). Mesmo o IgG1-ESAT6:CFP10, que apresentou excelente sensibilidade (88%) para a detecção de TB ativa (Grupo IV) vs Grupo II (AUROC = 0,94; IC95% = 0,88 - 1,0), não se mostrou promissora na detecção de LTBI entre os rCt (AUROC = 0,50; IC95% = 0,34 - 0,67; sensibilidade = 9%). Este perfil de resposta foi seguido pela IgG1-2019c com modesta sensibilidade para TB (59 %) e similar baixa sensibilidade para LTBI (13 %).

Ao comparar os Grupos I vs IV, AUROC ≥0,70 foi evidenciado para todos os antígenos, exceto para o Rv2031c, mas IgG1-ESAT6:CFP10 (88%) e IgG1-Rv3353 (74%) apresentaram as maiores sensibilidades na detecção da TB e o PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foi o terceiro antígeno melhor reconhecido por IgG1 entre os TB, com sensibilidade de 59% (tabela 4.4).

Assim, enquanto IgG1-ESAT6:CFP10 e IgG1-Rv3353 são mais imunorreativas entre os TB, a IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 apresentou-se mais seletiva nos LTBI (Grupo II) vs Grupo I. Resposta positiva a IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foi observada em apenas 7/42 (16,7%) dos rCt do Grupo III (TCT/LSA-ESAT6:CFP10 discordantes), dos quais 3/7 apresentaram positividade apenas ao teste de IGRA *in-house* (TCT⁻/LSA-ESAT6:CFP10⁺), enquanto 4/7 eram TCT⁺.

Tabela 4.4 - Valores de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e área sob a curva ROC (AUROC) para as respostas IgG1 contra os antígenos selecionados nas comparações entre os grupos controle (Grupo I), LTBI (Grupo II) e TB (Grupo VI).

		IgG1						
		Rv2031c	Rv2628	ESAT6:CFP10	PstS1 ₍₂₈₅₃₇₄₎ :CFP10	Rv2034c	Rv2029c	Rv3353
LTBI								
(Grupo II vs Grupo I)								
AUC		0,54	0,56	0,50	0,74	0,53	0,69	0,61
(95% IC)		(0,38 - 0,71)	(0,40 -0,72)	(0,34 - 0,67)	(0,59 - 0,88)	(0,36 -0,69)	(0,54 0,85)	(0,45 - 0,77)
Grupo I (n)		25	25	25	23	25	(24)	(25)
Grupo II (n)		(24)	(24)	(23)	(21)	(23)	(23)	(23)
Sensibilidade (%)		8	22	9	48	17	13	26
Especificidade (%)		92	92	92	91	92	92	92
Cut-off (D.O.)		<20,3	<22,5	>198,0	>73,3	>142,0	>86,5	>57,5
LTBI								
(Grupo IV vs Grupo II)								
AUC		0,67	0,88	0,91	0,64	0,74	0,78	0,82
(95% IC)		(0,49 - 0,85)	(0,79- 0,98)	(0,82 - 1,0)	(0,46 - 0,80)	(0,59 -0,89)	(0,64 - 0,92)	(0,69 - 0,95)
Grupo II (n)		(24)	(23)	(23)	(21)	(23)	(23)	(23)
Grupo IV (n)		(17)	(22)	(17)	(22)	(20)	(21)	(19)
Sensibilidade (%)		41	50	88	23	35	54	37
Especificidade (%)		91	91	91	90	91	91	91
Cut-off		> 158,8	> 202,3	> 148,0	>128,0	>185,0	> 93,50	> 157,0

TB							
(Grupo IV vs Grupo I)							
AUC	0,66	0,82	0,94	0,87	0,77	0,87	0,94
(95% IC)	(0,49 - 0,84)	(0,69 -0,95)	(0,88 – 1,0)	(0,76 - 0,98)	(0,63 -0,91)	(0,76 - 0,98)	(0,86 - 1,0)
Grupo I (n)	(25)	(25)	(25)	(23)	(25)	(24)	(25)
Grupo IV(n)	(17)	(22)	(17)	(22)	(20)	(21)	(19)
Sensibilidade (%)	41	9	88	59	38	52	74
Especificidade(%)	92	92	92	92	92	92	92
Cut-off	>158,8	>413,0	>151,5	> 72,3	>142,0	>88,0	>59,0

LTBI- Tuberculose latente, AUC (Área sob a curva), IC – Intervalo de confiança, IgG1 – Imunoglobulina G1, TB – Tuberculose

Nas análises de reatividade da IgG2, enquanto observa-se menor reconhecimento médio significativo deste subtipo aos antígenos Rv3353 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 nos pacientes TB (Grupo IV, $p < 0,05$), este grupo apresenta resposta significativamente mais elevada de IgG2-Rv2029c ($p < 0,01$), em relação todos os outros grupos, embora para o Grupo II sem diferença significativa (Figura 4.1). Para os outros antígenos não houve diferença significativa entre os grupos.

Na análise ROC as melhores AUROC (0,96, IC95% 0,92 - 1,0 e 0,89, IC95% 0,78 - 0,99) foram obtidas para a IgG2-Rv3353 com sensibilidades de 81% (TB vs Grupo I) e 43% (TB vs Grupo II), enquanto 52 % (TB vs Grupo I) foi evidenciada para IgG2-2029c (Tabela 4.5).

Assim, imunoreatividade negativa ou baixa se associam a TB ativa, mas reatividades mais elevadas foram conferidas àqueles com exposição ao bacilo, principalmente para os Grupos II e III, embora sem diferença significativa para o Grupo I, associados aos antígenos Rv3353 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 (Figura 4.1)

Tabela 4.5 - Valores de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e área sob a curva ROC (AUROC) para as respostas IgG2 contra os antígenos selecionados nas comparações entre os grupos controle (Grupo I), LTBI (Grupo II) e TB (Grupo VI).

		IgG2						
		Rv2031c	Rv2628	ESAT6:CFP10	PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	Rv2034c	R2029c	Rv3353
LTBI								
(Grupo I vs Grupo II)								
AUC		0,67	0,54	0,53	0,51	0,60	0,62	0,56
(95% IC)		(0,52 - 0,83)	(0,38 - 0,71)	(0,35 - 0,70)	(0,33 - 0,69)	(0,44 - 0,76)	(0,46 - 0,78)	(0,39 - 0,73)
Grupo I (n)		25	25	25	(20)	(25)	(25)	(25)
Grupo II (n)		21	24	21	(20)	(24)	(24)	(24)
Sensibilidade (%)		14	21	19	10	21	17	29
Especificidade (%)		92	92	92	90	92	92	92
Cut-off		> 178,5	> 112,5	< 26,50	> 333,5	> 116,5	> 211,5	> 135,0
LTBI								
(Grupo II vs Grupo IV)								
AUC		0,51	0,60	0,63	0,70	0,59	0,72	0,89
(95% IC)		(0,33 - 0,69)	(0,44 - 0,77)	(0,44 - 0,78)	(0,52 - 0,89)	(0,42 - 0,75)	(0,58 - 0,87)	(0,78 - 0,99)
Grupo II (n)		(21)	(24)	(21)	(20)	(24)	(24)	(24)
Grupo IV (n)		(24)	(24)	(23)	(20)	(23)	(23)	(21)
Sensibilidade (%)		13,5	12	17	5	17	35	43
Especificidade (%)		90	92	90	90	92	92	92
Cut-off		>232,0	> 164	> 350,5	< 6,5	< 16,5	>277,0	< 5,5
TB								
(Grupo I vs Grupo IV)								

AUC	0,67	0,69	0,66	0,79	0,53	0,82	0,96
(95% IC)	(0,52 – 0,82)	(0,53 - 0,84)	(0,49 - 0,81)	(0,64 - 0,94)	(0,36 - 0,69)	(0,70 -0,94)	(0,92 - 1,0)
Grupo I (n)	(25)	(25)	(25)	(20)	(25)	(25)	(25)
Grupo IV (n)	(24)	(24)	(23)	(21)	(23)	(24)	(21)
Sensibilidade (%)	17	42	43	20	17	52	81
Especificidade(%)	92	92	92	90	92	92	92
Cut-off	> 178,5	> 112,5	187,0	< 21,0	> 112,5	> 192,5	< 22.00

LTBI- Tuberculose latente, AUC (Área sob a curva), IC – Intervalo de confiança, IgG2 – Imunoglobulina G2, TB – Tuberculose , Grupo I - controles, Grupo II - latentemente Infectados Grupo III – provável infecção latente, Grupo IV – pacientes com tuberculose ativa.

Nas análises da subclasse IgG3, se observa baixa imunoreatividade, para o antígeno Rv2034, no Grupo IV (D.O.<0,46), ao passo que as imunoreatividades médias aumentam em ordem crescente, e significativamente, em direção ao Grupo II ($\leq 0,001$). De fato, apenas a IgG3-Rv2034 [AUROC = 0,93 (IC 95% 0,83 - 1,0)] mostrou alto potencial de imunoreatividade diferencial entre Grupo II (LTBI) vs Grupo IV (TB), ou seja, os TB falharam em produzir resposta de IgG3-Rv2034 comparados ao Grupo II e III (provável LTBI) (Tabela 4.6, Figura 4.1). O Grupo II também logrou imunoreatividade significativa maior ($p < 0,01$) para a IgG3-Rv2031c e -Rv2029c comparados ao Grupo IV e em menor significância para Rv3353 ($p < 0,05$) diferenciando os LTBI vs TB e provável LTBI (Figura 4.1). As respostas de IgG3-ESAT:CFP10 do Grupo IV e Grupo II foram mais elevadas em comparação as do Grupo I, entretanto apresentaram significância *borderline* ($p = 0,07$). Portanto, os antígenos Rv2031c, Rv2029c e Rv3353 tendem a ser mais reconhecidos por IgG3 pelos participantes do Grupo II. Entretanto, comparação do Grupo IV vs Grupo II apresentaram sensibilidades baixas (10% - 30%, Tabela 4.6) e apenas IgG3-Rv3353 mostrou potencial de discriminação do Grupo II vs Grupo III (Figura 4.1).

Tabela 4.6 - Valores de sensibilidade, especificidade, *cut-off* e área sob a curva ROC (AUROC) para as respostas IgG3 contra os antígenos selecionados nas comparações entre os grupos controle (Grupo I), LTBI (Grupo II) e TB (Grupo VI).

IgG3							
	Rv2031c	Rv2628	ESAT6:CFP10	PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	Rv2034	R2029c	Rv3353
LTBI (Grupo II vs Grupo I)							
AUC	0,64	0,56	0,72	0,52	0,69	0,70	0,69
(95% IC)	(0,48 - 0,80)	(0,39 - 0,72)	(0,57 - 0,86)	(0,35 - 0,68)	(0,54 - 0,84)	(0,54 - 0,85)	(0,52 - 0,87)
Grupo I (n)	25	25	25	25	24	24	19
Grupo II (n)	23	24	24	24	23	24	17
Sensibilidade (%)	22	25	33	21	30	33	23
Especificidade (%)	92,0	92,0	92,0	92,0	91,7	91,7	94,7
Cut-off	> 353,5	> 403,5	> 302,8	> 452,5	> 235,0	> 224,5	> 420,5
LTBI (Grupo IV vs Grupo II)							
AUC	0,78	0,68	0,51	0,54	0,93	0,79	0,82
(95% IC)	(0,64 - 0,92)	(0,51 - 0,84)	(0,34 - 0,69)	(0,36 - 0,71)	(0,83 - 1,0)	(0,67 - 0,92)	(0,66 - 0,97)

Grupo II (n)	23	24	24	24	23	24	17
Grupo IV (n)	20	21	20	22	23	24	22
Sensibilidade (%)	30	9	10	0	100	29	14
Especificidade (%)	91	92	92	92	91	96	94
Cut-off	< 41,0	< 50,5	> 846,5	< 6,5	< 53,5	< 29,5	< 51,0

TB (Grupo IV vs Grupo I)							
AUC	0,71	0,60	0,73	0,54	0,74	0,65	0,57
(95% IC)	(0,55 - 0,86)	(0,43 - 0,77)	(0,59 - 0,88)	(0,37 - 0,72)	(0,58 - 0,89)	(0,49 - 0,81)	(0,38 - 0,76)
Grupo I (n)	25	25	25	25	24	24	19
Grupo IV(n)	20	21	20	22	23	24	22
Sensibilidade (%)	20	9	25	0,0	4	37	4
Especificidade(%)	88	92	92	92	92	92	95
Cut-off	< 24,8	< 60,5	> 299,3	< 4,0	< 1,7	< 43,5	< 4,5

LTBI- Tuberculose latente, AUC (Área sob a curva), IC – Intervalo de confiança, IgG3 – Imunoglobulina G3, TB – Tuberculose , Grupo I - controles, Grupo II - latentemente Infectados Grupo III – provável infecção latente, Grupo IV – pacientes com tuberculose ativa.

4.4. Análises de Razão de Chances

A análise de razão de chances foi realizada objetivando encontrar possíveis variáveis independentes da infecção por *M. tuberculosis*, que pudessem estar associadas as respostas de subtipos de IgG, e identificar possíveis fatores de risco para positividade no teste de ELISA. Nesta análise foram selecionados apenas os testes que apresentaram melhor acurácia de acordo com a análise da curva ROC realizada: IgG1-ESAT-6:CFP-10, -PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e -Rv3353; IgG2-Rv3353 e IgG3-RV2034.

Assim, o fator idade ≥ 45 anos foi estatisticamente associado à positividade no ELISA IgG1-Rv3353, independentemente de o *status* clínico ser rCt (4,6, 95%CI 1,3-15,9) ou TB (2,3 95% CI 1,1-4,7). Nos rCt a positividade de IgG1-Rv3353 foi associada aos fatores de imagens de Raio-X de tórax alterada [4,8(1.3-18.5), $p=0,05$] e presença de comorbidade [6,1(1,8 – 21,4), $p=0,01$]. A positividade de IgG1- PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 está significativamente associada a imagem alterada de Raio-X de tórax [4,4 (IC 95% 1,2-16,1), $p=0,05$] e de LSA-ESAT6:CFP10 positivo [5,0 (1,7-15,2), $p=0,01$].

Interessantemente, rCt de casos índices com baciloscopia positiva apresentaram significativa maior chance de positividade para IgG2-Rv3353 OR (1,2, IC 95% 1,1-1,4), (Tabela 4.7). As demais variáveis (cultura do escarro, sexo, TCT, BCG, profissão, tipo de contato [intra ou extra-domiciliar], uso de medicamentos e histórico de TB) não mostraram associação significativa nas análises de *odds ratio* (Tabela 4.7).

4.7 – Variáveis clínicas e epidemiológicas associadas à positividade nos teste ELISA entre os contatos recentes de pacientes com TB (rCt) e pacientes com tuberculose ativa (TB), via análises de odds ratio. Foram selecionados apenas os testes que apresentaram altos valores de AUROC (>0,74): IgG1-ESAT-6:CFP-10, PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, Rv3353, IgG2 -Rv3353 e IgG3 -RV2034.

Fatores	Odds Ratio (95% IC)				
	IgG1 ESAT-6:CFP-10	IgG1 PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	IgG1 Rv3353	IgG2 Rv3353	IgG3 RV2034
rCt					
<i>Idade</i>					
n=	39	37	39	39	38
≥45 anos	1.3(0.25-7.0)	2.1(0.73-5.8)	4.6(1.3-15.9)*	1.9(0.53-6.6)	2.0(0.36-10.7)
n=	51	47	51	51	51
<45 anos	1.0 (referência)				
<i>Raio – X de tórax</i>					
n=	12	12	13	13	12
Alterado	1.2(0.13-11.3)	4.4(1.2-16.1)*	4.8(1.3-18.5)*	0.92(0.18-4.8)	0.9(0.83-0.97)
n=	71	65	70	70	70
Normal	1.0 (referência)				
<i>Co-morbidade</i>					
n=	33	33	33	33	34
Presente	2.6(0.4-16.1)	2.5(0.88-7.1)	6.1(1.8-21.4)**	2.3(0.59-9.2)	1.7(0.32-9.5)
n=	53	48	53	53	51
Ausente	1.0 (referência)				
<i>LSA-ESAT6:CFP10</i>					
n=	35	32	35	36	35
Positivo	0.74(0.13-4.3)	5.0(1.7-15.2)**	2.0(0.64-6.0)	1.1(0.34-3.8)	1.4(0.24-7.9)
n=	53	50	53	52	52
Negativo	1.0 (referência)				
<i>Baciloscopia do caso índice</i>					
n=	56	56	61	62	60
Positiva	0.87(0.27-2.7)	0.87(0.27-2.9)	0.78 (0.21-2.8)	1.2 (1.1-1.4)*	0.52 (0.06-4.8)

n= Negativa	21 1.0 (referência)	21	22	22	22
Grupo TB					
Idade					
n ≥45 anos	7 0.60(0.03-11.5)	10 1.1(0.19-5.9)	9 2.3(1.1-4.7)*	11 2.0(0.15-26.2)	11 1.1(0.91-1.3)
n <45 anos	11 1.0 (referencia)	12	10	10	12

4.5. *Árvore de Classificação*

Nesta etapa visamos estudar se a combinatória dos resultados dos ensaios mais promissores anteriormente descritos, com qualquer ponto de corte, resultaria em ganhos de acurácia ou em melhor diferenciação entre controles, LTBI e casos de TB através de análises de árvore de classificação/decisão. Árvores de classificação, como mostrada na Figura 4.2, são meios simples de construir classificadores que estabelecem grupos baseadas nos atributos de um conjunto de vários dados.

Portanto, fazendo uso da combinatória IgG1-ESAT6:CFP10 (D.O >151) e IgG2-Rv3353 (D.O<51) foi possível diferenciar indivíduos TB (16/18, sensibilidade de 88.9%) de todos os demais grupos com 100% de especificidade (IgG1-ESAT6:CFP10⁻/IgG3Rv3353⁺: Grupo I = 0/25, Grupo II = 0/23, e Grupo III = 0/42).

A classificação dos LTBI permaneceu não satisfatória e heterogênea, pois um pequeno grupo apresentou perfil IgG1-ESAT6:CFP10⁺/IgG2-Rv3353⁻ (Grupo I = 2/25 [8%], Grupo II = 2/23 [8,6%], Grupo III = 2/42 [5%], e Grupo IV = 0/25 [0%]) e os demais apresentaram perfil IgG1-ESAT6:CFP10⁻/IgG3Rv2034⁺/IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10⁺ (Grupo I = 3/25 [12%], Grupo II = 14/23 [60,9%], Grupo III = 14/42 [33%], e Grupo IV = 0/25 [0%]). Em conjunto, estes dois perfis classificaram 16/23 (69,5%) do Grupo II, 16/42 (38,1%) dos prováveis LTBI (Grupo III) e nenhum TB (0/25), porém 5/25 (20%) dos controles foram identificados, isto é 80% de especificidade e 69,5% de sensibilidade na comparação Grupo I vs Grupo II.

Os demais controles apresentaram perfil de resposta humoral IgG1-ESAT6:CFP10/IgG3Rv2034⁻ (Grupo I = 14/25 [56%], Grupo II = 4/23 [17%], Grupo

III = 25/42 [60%], e Grupo IV = 2/25 [8%]) ou ESAT6:CFP10⁻/IgG3Rv2034⁺/IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10⁻ (Grupo I = 5/25 [20%], Grupo II = 1/23 [4,3%], Grupo III = 0/42 [0%], e Grupo IV = 0/25 [0%]).

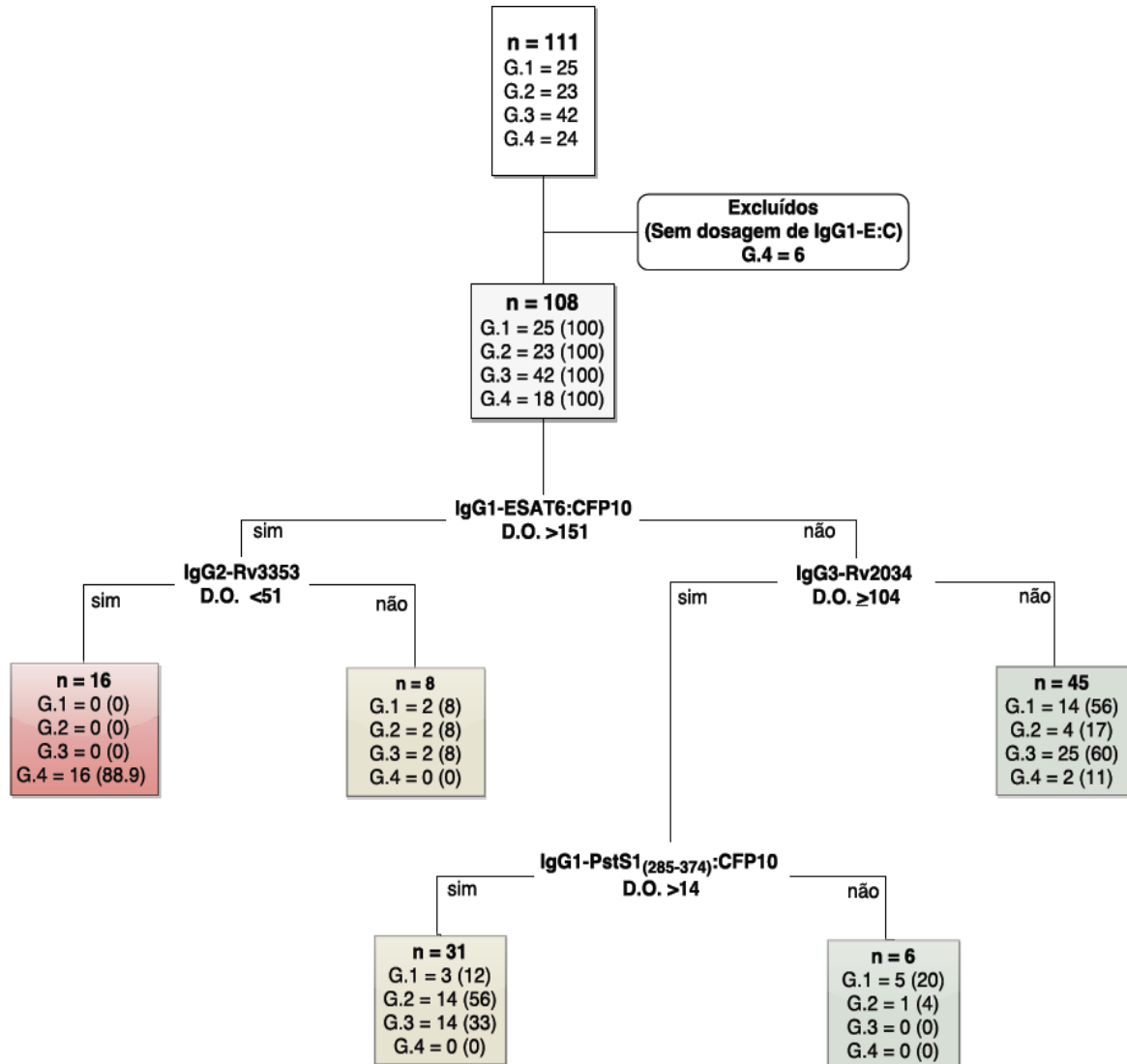


Figura 4.2 - Árvore de classificação utilizando a combinação das repostas de IgG1-ESAT6:CFP10, IgG3-Rv2034, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, expressas em D.O.

G.1= Grupo I, rCt negativo para o teste cutâneo a tuberculina (TCT) e a liberação de interferon gama (IGRA), G.2= Grupo II ou LTBI com TCT/IGRA⁺, G.3= Grupo III ou provável LTBI com TCT/IGRA discordantes e G.4= Grupo IV de pacientes com tuberculose ativa (TB).

4.6. **Correlação entre a resposta humoral e celular**

Com o objetivo observar a dinâmica das modulações da imunoreatividade humoral e celular na infecção latente e ativa por *M. tuberculosis*, as reatividades dos subtipos de IgG 1, 2 e 3 aos antígenos-específicos foram correlacionadas. Para tal, foram selecionados apenas os testes de ELISA que se mostraram nas análises de curva ROC os melhores resultados (IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₃₇₄₎:CFP10, IgG2-RV3353, IgG3-RV2034) comparando-as com a resposta por produção de IFN- γ por LSA, obtidas nos estudos anteriores (Araujo et al. 2015, Silva et al. 2014).

Para os casos de TB (Grupo IV) somente estavam disponíveis os dados de LSA-ESAT6:CFP10, no qual não foi observada nenhuma correlação significativa entre os níveis séricos das subclasses de IgG e a produção de IFN- γ . Por outro lado, cada Grupo de rCt apresentou um perfil único de correlação entre as respostas humoral e celular ao painel de antígenos micobacterianos estudados. Interessantemente, enquanto correlações negativas moderadas entre IgG2-Rv3353 vs LSA-Rv3353 (Rho= -0,58; $p \leq 0,05$) e IgG3-Rv2034 vs LSA-Rv2029c (Rho= 0,57; $p \leq 0,05$) foram observadas apenas no Grupo I (Tabela 4.8), o Grupo II (LTBI) apresentou correlação negativa significativa (Rho = -0,45 e -0,48, $p \leq 0,05$), ou *borderline* (Rho = -0,37 $p \leq 0,07$), entre IgG2-Rv3353 e para a metade dos LSA estudados, ou entre IgG1-PstS1₍₂₈₅₃₇₄₎:CFP10 vs LSA-Rv3353 (Rho= -0.51, $p < 0,05$) ou LSA-ESAT6:CFP10 (Rho = -0,37, $p = 0,07$) (Tabela 4.9). Os LSA-Rv2628 e LSA-Rv2034 não apresentaram correlação com a resposta humoral de subclasses de IgG em nenhum dos Grupos analisados.

Tabela 4.8 – Valores de correlação de Spearman entre os níveis séricos de subclasses de IgG específicos para os ensaios de ELISA IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, IgG3-Rv2034 e a produção de interferon-gama em ensaios de longa estimulação (LSA) para o Grupo I - controle.

LSA	Correlação de Spearman (n)			
	G.I - Grupo Controle			
	IgG1 ESAT6:CFP10	IgG1 PstS1 ₍₂₈₅₃₇₄₎ :CFP10	IgG2 RV3353	IgG3 RV2034

Rv2031c	0,23	0,26	0,14	-0,01
Rv2628	0,12	0,18	-0,22	0,15
ESAT6:CFP10	0,06	-0,11	0,17	-0,10
PstS1 ₍₂₈₅₃₇₄₎ :CFP10	-0,28	-0,01	-0,12	0,19
Rv2034	0,10	0,03	0,40	-0,38
Rv2029c	-0,13	0,18	0,01	-0,57*
Rv3353	-0,22	-0,06	-0,58*	-0,40

* $p \leq 0,05$, LSA: ensaio de liberação de interferon-gama de longa estimulação.

Alta resposta por produção de IFN- γ aos LSA-ESAT6:CFP10 e LSA-Rv3353 se correlacionou significativamente com menor imunoreatividade de IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 no Grupo II, ou vice-versa (Rho= -0,51, $p < 0,05$) (Tabela 4.9). Nos rCt do Grupo III se observa correlação negativa fraca entre a resposta celular de LSA-Rv2031c, e as reatividades de IgG1-ESAT6:CFP10 (Rho= -0,29, $p < 0,05$) (Tabela 4.10).

Tabela 4.9 – Valores de correlação de Spearman entre os níveis séricos de subclasses de IgG específicos para os ensaios de ELISA IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, IgG3-Rv2034 e a produção de interferon-gama em ensaios de longa estimulação (LSA) para o Grupo II - LTBI.

LSA	Correlação de Spearman (n)			
	G.II - Grupo LTBI			
	IgG1ESAT6:C FP10	IgG1 PstS1 ₍₂₈₅₃₇₄₎ :CFP10	IgG2 RV3353	IgG3 RV2034
Rv2031c	0,11	0,06	-0.37#	-0,03
Rv2628	0,05	-0,30	0,02	0,029
ESAT6:CFP10	-0,13	-0.39#	-0,22	0,14
PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	0,05	-0,09	-0,48*	-0,01
RV2034	-0,04	0,23	-0,30	-0,23

Rv2029c	-0,01	-0,35	-0,48*	0,20
Rv3353	0,01	-0,51*	-0,19	-0,06

* $P \leq 0.05$, # $P = 0.07$, ensaio de liberação de interferon-gama de longa estimulação (LSA)

Tabela 4.10 – Valores de correlação de Spearman entre os níveis séricos de subclasses de IgG específicos para os ensaios de ELISA IgG1-ESAT6:CFP10, IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, IgG2-Rv3353, IgG3-Rv2034 e a produção de interferon-gama em ensaios de longa estimulação (LSA) para o Grupo III.

LSA	Correlação de Spearman (n)			
	Grupo Provável LTBI - G.III			
	IgG1 ESAT6:CFP10	IgG1 PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	IgG2 RV3353	IgG3 RV2034
Rv2031c	-0,29*	0,15	0,05	0,01
Rv2628	-0,25	0,25	0,11	0,17
ESAT6:CFP10	-0,25	0,25	0,14	0,04
PstS1 ₍₂₈₅₋₃₇₄₎ :CFP10	-0,11	0,46**	-0,04	0,06
Rv2034	-0,15	0,09	0,01	0,18
Rv2029c	-0,26	0,23	0,02	-0,05
Rv3353	-0,03	0,30	-0,26	-0,01

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ensaio de liberação de interferon-gama de longa estimulação (LSA)

5. DISCUSSÃO

A melhor compreensão sobre os mecanismos da resposta imune humoral na infecção latente e ativa por *M. tuberculosis*, pode contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas que viabilizem o seu efetivo controle. Há evidências de que *M. tuberculosis* promove uma ampla resposta tipo Th1, bem como Th2, e que através de diferentes vias induz linfócitos B a produzir anticorpos (Abebe & Bjune 2009).

Os pacientes com TB ativa, assim como os latentemente infectados, são os reservatórios são os reservatórios naturais do bacilo de Koch (Mattos et al. 2016). Entretanto, diferentemente do diagnóstico da TB ativa, que se baseia na identificação de sintomas e na visualização direta do bacilo ou de seus componentes em espécimes clínicos, a LTBI é detectada indiretamente, por uma resposta imunológica do hospedeiro à componentes micobacterianos. Portanto, positividade ao IGRA e/ou ao TCT pode ser fruto de células de memória de uma infecção passada. Os exames radiográficos também podem ser utilizados na identificação da LTBI, mas, podem apresentar alterações inespecíficas para TB (CDC 2013). Assim, optamos pela utilização dos resultados de ambos os testes disponíveis para detecção de LTBI na classificação dos rCt arrolados neste estudo. Não obstante, deve-se ressaltar que estes indivíduos fazem parte de uma população heterogênea, composta de pessoas predominantemente vacinadas com BCG na infância, mas de diferentes classes sociais, faixas-etárias, hábitos de saúde/higiene e que podem ter sofrido diferentes desfechos pós-exposição ao *M. tuberculosis* (não-infecção, infecção e cura, infecção recente, LTBI remota, ou infecção e progressão), aliás como qualquer população de área endêmica. Esta variabilidade está refletida na variação dos intervalos de interquartil em todos os Grupos de rCt estudados. Por outro lado, tal arranjo, traz para o presente estudo importância única de triagem de marcadores imunológicos e melhor entendimento de resposta imune humoral por subclasses (IgG1, G2 e G3) na infecção por *M. tuberculosis*.

O presente estudo favorece ao reconhecimento de possíveis biomarcadores sorológicos com potencial para auxiliar na identificação de LTBI/TB em população de rotina dos serviços públicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando-se de uma metodologia custo-adequada à países em desenvolvimento: o ELISA. Mas fundamentalmente oferece a oportunidade de conhecer melhor a dinâmica da

resposta imune humoral por subclasses de Ig a diferentes antígenos associados a diferentes fases da infecção/ doença em nossa população.

A participação prevalente de indivíduos do sexo masculino entre os TB, mas não entre os rCt, são similares a achados em outras investigações. Um dos fatores que contribuem para este perfil está relacionado a hábitos culturais dos homens, que geralmente oferecem resistência à procura de serviços de saúde e também se expõem mais a fatores de risco dentre eles o abuso de álcool, tabagismo e exposição ocupacional a agressores inalantes, e geralmente, quando sadios, são pouco aderentes à participação voluntária em estudos investigativos de prevenção (Longhi 2013, Hur et al. 2015).

Sabe-se que os bacilos podem adaptar-se ao ambiente hostil promovido pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, controlando sua própria expressão gênica. E, dependendo da fase de infecção, a expressão de determinados genes pode ser prioritariamente modulada (Demissie et al. 2006). Logo, é necessário investigar a resposta imune de um grupo maior, e bem selecionado, a componentes micobacterianos imunogênicos associados à infecção e/ou latência. Na literatura internacional são extensivamente estudados e referenciados como constitutivamente expressos os componentes de parede celular ESAT6, CFP10 e PstS1, ou seja, poderiam atuar como marcadores da presença bacilar em qualquer fase da infecção. Enquanto que outros antígenos, que embora sejam menos estudados (Rv2029c, Rv2031c, Rv2628 e Rv2034), estariam mais expressos quando a bactéria é submetida a condições que mimetizam a fase de latência do bacilo (como privação de oxigênio, nutrientes e exposição ao óxido nítrico) (Singh et al. 2014). Ainda, genes hipotéticos, como o *Rv3353*, já descrito como expresso na fase de crescimento ativo de *M. tuberculosis*, porém suas funções não se encontram totalmente esclarecidas.

A IgG é uma das proteínas do soro humano em maior concentração (~10-20% do total de proteínas plasmática), comparadas as outras 4 classes de imunoglobulinas (IgM, IgD, IgA, e IgE). De fato, estas glicoproteínas são semelhantes, mas, diferem na estrutura de suas cadeias pesadas e possuem funções efectoras distintas. IgG também pode ser sub-classificada por suas propriedades físico-químicas (ligação das cadeias leve e pesada, tamanho da dobradiça, número de pontes dissulfeto que liga as duas cadeias pesadas), biológicas e antigênicas em quatro subclasses que foram nomeadas em sua ordem de abundância decrescente no plasma humano em IgG1 (60-70%), IgG2 (19-31%),

IgG3 (4-8%) e IgG4 (2-6%), em condições normais. Em nosso estudo, IgG4 não apresentou significativa diferença de imunoreatividade para os antígenos propostos entre os pools de rCt TCT⁺ e TCT⁻, nas etapas de padronização. Esta baixa resposta de IgG4 também foi obtida, em estudos similares, utilizando o antígeno micobacteriano de latência Erp e os de superfície secretados ESAT-6 e Ag85B (Martinez et al. 2007). Uma vez que a deficiência da subclasse IgG4 é pouco comum, a sua característica de ser preferencialmente induzida por exposição repetida a alérgenos, ou prolongada a Ag em patologias não infecciosas e demonstrar menor afinidade para antígenos alvos comparados as outras subclasses de IgG, talvez em parte explique sua baixa afinidade a antígenos micobacterianos (Lowe et al. 2013, Vidarsson et al. 2014).

O reconhecimento de antígeno de superfície secretado ESAT-6, por IgG sérica, foi descrito na TB (Baumann et al. 2013), assim como maior reatividade específica da subclasse IgG1, seguida pela IgG3 (Martinez et al 2007, Matos et al, 2016). Matos et al (2016), analisando pacientes de Minas Gerais, demonstraram predominância de IgG1-ESAT6 e =CFP10, isolados. Corroborando estes achados, descrevemos maior reatividade destas subclasses utilizando as proteínas fusionadas ESAT-6:CFP-10, porém com maior número de participantes dando significância estatística ao dados.

Imunoreatividade significativamente maior, e em ordem decrescente, foi evidenciada em nosso estudo, para IgG1-Rv2628, -Rv2029c e -Rv3353 no Grupo IV (TB) e, interessante, pela primeira vez para -PstS1(285-374):CFP10. Entretanto, apenas em nosso estudo, Rv2029c foi similarmente reconhecida por IgG2 na TB. Para a maioria dos antígenos o reconhecimento de IgG3 foi menor ou negativo no Grupo IV, mas com significância apenas para IgG3-PstS1(285-374):CFP10 e -Rv3353.

A resposta imune humoral para antígenos micobacterianos podem diferir de acordo com os estágios da infecção no hospedeiro (Kunnath-Velayudhan & Gennaro 2011). Os LTBI podem produzir menos resposta por Ac, a antígenos diferentes, em relação àqueles com a TB ativa. Também há dados sugerindo que a intensidade da resposta imune humoral se correlaciona com carga bacilar no hospedeiro (Achkar et al. 2010, Kunnath-Velayudhan & Gennaro 2011, Yu et al. 2012). Considerando estes autores, a predominância de subclasses de IgG em TB, classicamente, seria relacionada com uma não proteção, entretanto a maioria dos TB possui resposta imune celular com alta produção de IFN- γ , que é considera efetiva contra a TB.

Portanto, é lícito especular que os Ac podem ser biomarcadores para doença, assim como produção de IFN- γ poderia indicar progressão de infecção para doença (Lin et al. 2009, Diel et al. 2011)

A predominância do isotipo IgG1-ESAT-6:CFP-10, além dos outros Ags aqui estudados, em pacientes com TB ativa, corrobora estudos prévios de que o antígeno ESAT6:CFP10 é um bom marcador de TB ativa (Mattos et al. 2016), pois as altas dosagens de IgG contra os antígenos secretados ESAT6 e CFP10 parecem estar associadas com bacilos viáveis e metabolicamente ativos. De fato, nas análises de curva ROC, o ensaio de IgG1-ESAT6:CFP10 apresentou a melhor sensibilidade (88%) na detecção de TB comparando-se com os participantes rCt dos Grupos I (controle) ou Grupo II (LTBI), mantendo especificidade >90%. Característica similar para a IgG1-Rv3353, foi aqui obtida com acurácia levemente inferior (74%). Ambos os antígenos são descritos como expressos na fase ativa de crescimento de *M. tuberculosis* (Mattos et al. 2010, Mattos et al. 2016). Entretanto, não se mostraram promissores na detecção de infecção latente.

Por outro lado, embora IgG1-Rv2628 também tenha apresentado este mesmo perfil no Grupo TB, um pequeno número de indivíduos do Grupo I reconheceu esta proteína (Figura 4.1). Alta resposta por produção de IFN- γ ao antígeno Rv2628 foi previamente associada a LTBI remota, quando comparadas com as de indivíduos com infecção recente ou com TB ativa (Goletti et al. 2010). Assim, é possível que, diferentemente da resposta de IgG1-ESAT6:CFP10 e -Rv3353, a reatividade da IgG1-Rv2628 poderia estar detectando indivíduos com LTBI remota, que não respondem aos testes marcadores de infecção, TST e IGRA-ESAT-6:CFP-10.

A reatividade significativamente alta da subclasse IgG1 na TB foi inversamente evidenciada pela significativa reatividade baixa ou negativa da subclasse de IgG2-Rv3353 e -PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10. Porém, reatividade negativa de IgG2-Rv3353 foi evidenciada apenas no grupo IV ou TB (81%) e, juntamente com a AUROC (0,96; 95%CI 0,92 – 1,0), esses parâmetros foram levemente superiores aos obtidos pela IgG1-Rv3353 (sensibilidade = 74%; AUROC = 0,94; 95%CI 0,86 – 1,0) e fortemente elevados comparados aos obtidos com a IgG3 (sensibilidade = 4%; AUROC = 0,57; 95%CI 0,38 – 0,76). Portanto, score positividade de IgG1 e negatividade de IgG2 ao Rv3353 sugere potencial para diagnóstico de doença, mas não de LTBI (sensibilidade \leq 29%).

Por outro lado, os ensaios de IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 foram os mais promissores para a detecção de rCt-LTBI mas, apresentando baixa sensibilidade (48

%, Tabelas 4.5 e 4.4). De fato, a região compreendida entre os aminoácidos 285 – 374 do gene PstS1, que está incluído na nova fusão, é descrita como seletivamente mais reconhecida por indivíduos infectados (TCT⁺) que por pacientes com TB (Harboe, 1992, Palma et al. 2011). Estudos utilizando a fusão gênica das sequências do PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎ com o CFP10 mostraram melhor detecção de rCt-TCT⁺ (WBA: 23/54, 42,6%; LSA: 26/54, 48,1%) que o ESAT6:CFP10 (WBA: 18/54, 33,3%; LSA: 24/54, 44,4%) por produção de IFN- γ na resposta imune celular (Araujo et al. 2014). Entretanto, é necessário investigar em estudos futuros a imunoreatividade humoral para o peptídeo PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎, pois em estudo prévio IgG-CFP10 apesar de adicionar especificidade na TB, é pouco sensível na LTBI (Zhang et al. 2015).

É interessante notar o perfil de significativa baixa ou ausência de produção de IgG2 contra a quimera proteica PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e a Rv3353 no Grupo IV (TB), mas aumentando a imunoreatividade em direção aos LTBI (Grupo II). Na ausência de modulações por células T, antígenos polissacarídeos, diferentemente dos aqui analisados, induzem mudança de classe para IgG2 e sua ausência estaria associada a susceptibilidade a doença infecciosa (Vidarsson et al. 2014). Embora para todos os antígenos testados, menor produção de IgG2 no Grupo TB foi obtida, note-se que não houve diferença significativa para os outros Grupos. Assim, a ausência de reatividade de IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e -Rv3353 na TB, pode estar associada a vulnerabilidade a doença. Gupta et al. (2005) observou evento similar para o antígeno ES-31, que é uma glicoproteína secretada e excretada de *M. tuberculosis*. Porém, o presente estudo é o primeiro com este perfil de IgG2 para PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e Rv3353, sugerindo que o equilíbrio da resposta humoral na TB parece ser dinâmico, e diferencialmente modulado dependendo do antígeno e da fase de infecção, pois para IgG2-2029c a imunoreatividade foi significativamente elevada na TB diminuindo em direção ao Grupo I.

Correlação negativa entre a resposta humoral de IgG2-Rv3353 e a resposta celular, por produção de IFN- γ , foi observado no Grupo LTBI (Grupo II, Tabela 4.9) para metade dos antígenos testados. É importante notar que todas as correlações negativas observadas foram com antígenos associados a latência (Rv2031c, Rv2029c) e com PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, sugerindo que a resposta IgG2-Rv3353 aos antígenos Rv2031, Rv2029 e PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 se correlaciona moderada e inversamente com a resposta celular por produção de IFN- γ durante a LTBI. Já no Grupo controle IgG2-Rv3353 mostrou correlação negativa com a resposta celular por produção de INF- γ induzida pelo mesmo Ag. Desse modo observou-se uma maior

reposta de IgG2 e uma baixa produção de INF- γ ao antígeno Rv3353. Da mesma forma IgG3-Rv2034 também apresentou correlação negativa com o LSA-Rv2029c. Interessantemente, dentre os indivíduos com provável LTBI (Grupo II), correlação positiva entre a resposta humoral IgG1-PstS1₍₂₈₅₃₇₄₎:CFP10 e a de IFN- γ mediada por célula foi encontrada. Em oposição, fraca correlação negativa foi observada entre IgG1-ESAT6:CFP10 e LSA-Rv2031. Mais uma vez, estas correlações heterogêneas evidenciam quão dinâmica é a resposta imune corroborando a heterogeneidade da resposta imune humoral/celular de acordo com o estágio da infecção. Estes achados enfatizam a necessidade de estudos mais meticolosos quanto homogeneidades dos grupos de participantes arrolados para melhor investigar uma possível função protetora dos Ac TB/infecção.

Nas análises de IgG3, embora com imunoreatividade para ESAT6:CFP10, não há diferença significativa entre Grupos, assim como para PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e Rv2628. Resultado similar de IgG3-ESAT6/CFP10 foi descrito Martinez et al, em um pequeno grupo amostral. De um modo geral, o Grupo TB induz menor reatividade de IgG3 para a maioria dos LAA (Rv2034, Rv2029, Rv2031c) e Rv3353 com aumento médio significativo em direção ao Grupo II (LTBI, $p > 0.01$), porém com maior diferença significativa para IgG3-Rv2034 ($p = 0.001$). Essas variações na reatividade de IgG3 pressupõe estar correlacionada ao tipo de antígeno e seu papel na patogênese da TB, bem como os estímulos de citocinas para sua indução. A IgG3 é descrita como a mais eficaz das subclasses de IgG na ativação do sistema via complemento e mediar a lise de monócitos e linfócitos portadores de receptores Fc (Martinez et al. 2007). Anticorpos IgG3 também são descritos como potentes indutores de resposta imune efetora e ter efeito pró-inflamatório, com a vantagem de ter vida média curta o que limita uma danosa exacerbada resposta inflamatória (Vidarsson et al 2014), assim, altos níveis de IgG3-Rv2034 nos grupos expostos a TB pode estar sugerindo proteção e contenção de progressão para TB. Porém, função protetora não deve ser sugerida apenas à IgG3 pois, IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e -Rv3353 poderiam ter o mesmo papel. Portanto, estudo prospectivo de acompanhamento da resposta humoral nestes rCt são necessários para elucidar se possuem papel protetor, e se a diminuição da resposta humoral poderia indicar quebra na proteção e risco de LTBI progressor. Na população arrolada, dois rCt (Grupo II e Grupo III, respectivamente), que recusaram o tratamento profilático para LTBI, progrediram para TB ativa em diferentes períodos de tempo. Um deles já apresentava baixa resposta de IgG3-Rv2034 e de IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e -

Rv3353, TCT>10mm e IGRA⁻. O histórico clínico epidemiológico informou serem contato intradomiciliar, ter R-X de tórax com alteração de imagem compatível com TB, mas sem cavidade, desenvolvendo TB ativa 4 meses depois de arrolados no estudo. Infelizmente não temos soro de acompanhamento desses rCt.

A respeito da discriminação de LTBI vs TB por IgG3-2034 ($p=0,001$) ser altamente significativa o mesmo não ocorreu entre LTBI vs Grupo I. Entretanto, mesmo que este grupo seja considerado controle por apresentar o TCT/IGRA⁻, estes indivíduos também foram expostos ao *M. tuberculosis*. O Rv2034 pertencente à família ArsR, e é identificado como regulador de transcrição envolvido na regulação do metabolismo lipídico e na resposta a adaptação a hipóxia, além de ser capaz de regular positivamente a expressão de genes *DosR* (dentre eles o *Rv2031c*). Em estudo prévio, a produção de IFN- γ por células da resposta imune celular foi mais elevada para este antígeno em indivíduos recentemente expostos e infectados, e ausentes nos casos de TB ativa. Perfil este também encontrado para o Rv2031c (Araujo et.al 2015). Similar resposta de Ac foi evidenciada para esses Ags com IgG3, mas de um modo geral as respostas do IGRA foram mais promissoras na identificação de LTBI. Araújo et al (2015) mostraram que combinando os resultados de LSA IFN- γ aos antígenos Rv2029c + RV2031c + Rv2034 sensibilidade de 95% (19/20) e especificidade de 88,2% (2/17) foram obtidas na comparação LTBI (TST⁺/LSA⁺) vs controle (TST⁻/LSA⁻). Assim, a ausência ou baixa resposta de IgG3-Rv2034 e -Rv2031c e IgG2-Rv3353 e -PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, pode estar sugerindo que os indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* estariam conseguindo montar uma resposta que limita a replicação dos bacilos, e a progressão da doença, mantendo-os sob condição de latência, induzindo a expressão de LAA e reconhecimento pela imunidade adaptativa celular e/ou humoral. É importante, ainda, mencionar que alguns controles apresentaram perfil de resposta semelhante ao observado nos TB (baixa produção de IgG3). Isto pode dificultar a utilização deste biomarcador sozinho no diagnóstico diferencial LTBI/TB, mas já foi descrito que há heterogeneidade de resposta por Ac, bem como de outros biomarcadores imunológicos em humanos. Foi descrito que apenas poucos pacientes TB produzem Ac com especificidade de Ac protetor para o Ag micobacteriano arabinomanana (Navoa et al. 2003), enquanto que mais recentemente (Encinales et al. 2010) evidenciou-se que em LTBI com altos títulos de Ac, parte bloqueavam a resposta imune celular enquanto outros estimulavam sua proliferação, portanto estudos mais cuidadosos são necessários para investigar a função dos Ac induzidos na infecção e doença.

Por outro lado, é importante mencionar que nem todos os indivíduos infectados por *M. tuberculosis* vão progredir para a doença ativa. Assim, na tentativa de buscar melhores alternativas de identificação de LTBI utilizou-se combinação dos ensaios com as diferenças estatísticas mais significativas na discriminação dos grupos estudados. A utilização da combinatória IgG1-ESAT6:CFP10^{>151}/IgG3-Rv2034^{≥104}/ IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10^{>14}, tornou possível selecionar 60% dos considerados LTBI (Grupo II), 33% dos prováveis LTBI (Grupo III) e 12% do Grupo I (especificidade = 88%). Interessantemente, a análise de árvore de classificação também direcionou para a combinatória de IgG1-ESAT6:CFP10^{>151}/IgG2-Rv3353^{<51} como melhor opção para a detecção de TB, com alta sensibilidade (88,9%) e especificidade (100%). Portanto, a detecção de subclasses de IgG tem potencial para desenvolvimento de teste rápido, pouco invasivo e fácil operação para auxiliar no diagnóstico da TB. Porém para a indicação dos infectados em maior risco de progressão necessita de maiores estudos, principalmente prospectivos com monitoramento da modulação das respostas imunes humoral/celular ao longo de pelo menos dois anos, período em que os de maior risco abririam um quadro ativo da TB.

A análise de razão de chance nos rCt, as variáveis raio-X, co-morbidade, LSA positivo, contato com CI com baciloscopia negativa e maior idade foram significativamente associados a positividade em alguns dos testes. A variável idade ≥ 45 anos foi significativamente associada como fator de risco para positividade no teste para ambos os participantes, rCt e TB, talvez por estarem mais tempo em área endêmica e maiores chances de exposição ao *M. tuberculosis*. Alterações no raio-X de tórax foram associadas ao maior risco de positividade para IgG1-Rv3353 e - PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10, os quais estão associados a TB/infecção. Estudos em coortes LTBI, as variáveis classificadas como fatores de risco: raio-X alterado, co-morbidades, contato próximo com TB, entre outras, mostram-se em maior risco de ativação da TB (Ai et al. 2016).

Por outro lado, nota-se que a presença de qualquer co-morbidade aumenta em 6,1 vezes as chances para a positividade no ELISA IgG1-Rv3353 entre os rCt, levantando a possibilidade de reatividade cruzada deste teste, os quais ambos Ac e Ag apresentaram melhor reatividade para fase ativa da doença. Dentre os rCt que tinham alguma co-morbidade, 80% estavam incluídos no Grupo II (LTBI, 36 %) e III (provável LTBI, 43 %), sugerindo que a presença de co-morbidades levaria a um maior risco de susceptibilidade ao desenvolvimento de TB. A positividade para IgG1-

Rv3353 é significativamente mais elevada no TB, assim como contatos, de caso índice com baciloscopia positiva, apresentam significativa maior chance de positividade para IgG2-Rv3353, sugerindo maior chance de estarem infectados.

O presente estudo mostrou que a resposta humoral por subclasses de IgG pode ser dinâmica de acordo com a especificidade para os antígenos alvos. Imunodominância de IgG1-ESAT-6:CFP-10, Rv2628 e Rv3353 ($p=0,001$), Rv2034 e Rv2029 ($p<0,05$) e ao PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 ($p=0,001$) para TB vs todos os outros grupos. A subclasse IgG2 falhou em produzir resposta significativamente discriminatória para qualquer dos grupos com a maioria dos antígenos, exceto Rv2029c no qual o Grupo IV (TB) apresentou maior resposta em relação aos Grupos I e III. Já para IgG2-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10 e -Rv3353, bem como para IgG3-Rv2034, onde a imunoreatividade foi negativa ou baixa para TB e mais elevadas nos outros grupos, sugeriria que estes Ac poderiam estar exercendo uma ação protetora entre os rCt e potencialmente discriminando TB de LTBI. Alguns estudos (Gupta et al 1997, Sada et al 1983) sugeriram que ausência ou baixa produção de Ac estaria associada com um quadro de TB disseminada, entretanto em nosso estudo este perfil foi observado em casos de TB pulmonar.

As subclasses de IgG tem potencial para serem exploradas na detecção da infecção por *M. tuberculosis*, e a combinação de antígenos e anticorpos (IgG1-ESAT6:CFP10^{>151}/IgG2-Rv3353^{<51}), forneceu a interessante possibilidade de identificação de TB ativa com 88% de sensibilidade e alta especificidade (100%), bem como restringiu a número de infectados ao adicionar a IgG3-Rv2034^{≥104}/IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10^{>14} na análise combinatória. Porém, o papel destes anticorpos e antígenos, para auxiliar no diagnóstico da TB necessita ser validado, e para os rCt estudos prospectivos de modulação das subclasses de IgG, aos diferentes Ags, precisam ser realizados para confirmar a contribuição destes como mais uma estratégia no controle da TB.

6. CONCLUSÃO

- IgG1 mostrou maior imunoreatividade na TB ativa, ao passo que, IgG3 parece ser mais produzida por indivíduos LTBI.
- A IgG1-Rv3353 e IgG1-ESAT6-CFP10 demonstraram melhor acuraria para detecção de indivíduos com TB ativa, embora reatividade significativa de IgG1 para todos os antígenos estudados foi encontrada, exceto Rv2031.
- Pela primeira vez IgG1 para proteína fusionada PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10-IgG1 foi demonstrada com melhor potencial em discriminar LTBI de controles, porém com sensibilidade inferior <50%.
- IgG3-Rv2034 apresentou melhor potencial em diferenciar TB de LTBI, já que os doentes não montaram resposta de IgG3 a este antígeno. Mas, não mostrou imunoreatividade diferencial entre o grupo I controle e Grupo II LTBI.
- A árvore de classificação aumentou o potencial de detecção para TB, pois a combinatória IgG1-ESAT6:CFP10^{>151}/IgG2-Rv3353^{<51} manteve alta sensibilidade (88%) e especificidade (100%), sugerindo ser uma ferramenta útil para auxiliar o diagnóstico da TB.
- Entretanto, para os rCt combinatória acima, bem como a de IgG3-Rv2034^{≥104}/IgG1-PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10^{>14}, selecionou parte dos rCt, porém estudo prospectivo é necessário para conhecer seu potencial de identificar indivíduos com LTBI em maior risco de adoecimento.
- A resposta humoral de IgG2-Rv3353 mostrou correlação inversa com a resposta celular por produção de IFN-γ aos antígenos Rv2031, Rv2029 e PstS1₍₂₈₅₃₇₄₎:CFP10 no grupo LTBI.
- Todos estes dados confirmam mais uma vez a heterogeneidade e complexidade da resposta imune humana na TB.

7. PERSPECTIVAS

1 - Realizar estudo prospectivo de acompanhamento de rCt com monitoramento das repostas humoral e celular, durante período de dois anos, o qual é o de maior risco para progressão de LTBI para TB ativa e avaliar o potencial destes testes para indicar, entre os infectados, os que estão em maior risco de adoecimento.

2 - Investigar a resposta de subclasses de IgG ao peptídeo PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎ e verificar seu potencial de detecção para LTBI, comparado ao antígeno quimérico PstS1₍₂₈₅₋₃₇₄₎:CFP10.

3 – Avaliar a resposta humoral e celular em coorte com número maior de participantes com TB ativa, de modo a esclarecer as correlações entre a produção de anticorpos e a resposta por IFN- γ a antígenos micobacterianos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman A, Pillai SHI. 2006. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Elsevier. Rio de Janeiro.

Abebe F, Bjune G 2009. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 157: 235–243.

Achkar JM, Chan J, Casadevall A 2015. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol. Rev.* 264: 167–181.

Achkar JM, Jenny-Avital E, Yu X, Burger S, Leibert E, Bilder PW, Almo SC, Casadevall A, Laal S 2010. Antibodies against immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in subjects with suspected tuberculosis in the United States compared by HIV status. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 384–392.

Achkar JM, and Arturo Casadevall 2014. Antibody-Mediated Immunity against Tuberculosis: Implications for Vaccine Development. 13: 250–262.

Adams F 1985. Hippocrates (460-370 BCE) Of the Epidemics. The Genuine Works of Hippocrates. p. 352-354

Agnaldo, Lopes J, Jansen JM, Capone D 2006. Patogenia E Imunologia. *Rev. do Hsopital Univ. Pedro Ernesto, UERJ* 5: 27–34.

Ai J-W, Ruan Q-L, Liu Q-H, Zhang W-H 2016. Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerg. Microbes Infect.* 5: e10.

Albrethsen, J., Agner, J., Piersma, S. R., Højrup, P., Pham, T. V., Weldingh, K., Jimenez, C. R., Andersen, P., & Rosenkrands, I. 2013. Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies nutrient-starvation-responsive toxin-antitoxin systems. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(5), 1180–1191.

Araujo LS 2015. Profile of interferon-gamma response to latency-associated and novel in vivo expressed antigens in a cohort of subjects recently exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 95: 751–757.

Araujo LS, Mello FCDQ, Silva NDBM da, Leung J a. M, Machado SM a., Sardella IG, Maciel RDM, Saad MHF 2014. Evaluation of Gamma Interferon Immune Response Elicited by the Newly Constructed PstS-1(285-374):CFP10 Fusion Protein To Detect Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 21: 552–560.

Araujo LS 2015, Avaliação de biomarcadores de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* via resposta celular e de transcrição gênica em coorte prospectiva de contatos recentes de pacientes tuberculosos. Tese, Fundação Oswaldo Cruz- pós-graduação em Biologia celular e Molecular. Rio de Janeiro.

Bai XJ, Liang Y, Yang YR, Feng JD, Luo ZP, Zhang JX, Wu XQ 2016. Potential novel markers to discriminate between active and latent tuberculosis infection in Chinese individuals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 44: 8–13.

Baumann R, Kaempfer S, Chegou NN, Nene NF, Veenstra H, Spallek R, Bolliger CT, Lukey PT, Helden PD Van, Singh M, Walzl G 2013. Serodiagnostic markers for the prediction of the outcome of intensive phase tuberculosis therapy. *Tuberculosis* 93: 239–245.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. [Acessado em 26 de outubro de 2016].Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. [Acessado em 21 de outubro 2016] Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Vol.44 nº 2. Brasília: 2014. [Acessado em 15 de out de 2016].Disponível em:http://funedmg.gov.br/wpcontent/uploads/2014/06/Boletim_Tuberculose_PNCT_2014.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Vol.46 nº 9. Brasília: 2015. [Acessado em 10 de nov de 2016]. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007->

Brites D, Gagneux S 2015. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunol. Rev.* 264: 6–24.

Campos HS 2006. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. Pulmaão. Rio de Janeiro 15: 29–35.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC 2013. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Health Care Providers. [Acessado em 11 de nov de 2016]. Disponível em <http://www.cdc.gov/tb/publications/lbti/diagnosis.htm>.

Coelho-castelo A a. M, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC 2009. Resposta imune a doenças imune inf ecciosas infecciosas. *Medicina (B. Aires)*. 42: 127–142.

Cousins D V, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodri D, Loureiro J, Romano MI 2016. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex : 1305–1314.

Daniel TM 2000. Pioneers in Medicine and their Impact on Tuberculosis. Rochester, NY; University of Rochester Press, p. 4, 29, 46-48, 50-51, 74-76

Daniel TM 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med. Center for Global Health and Diseases, USA*. 2009 100: 1862–1870. Darling MI, Donoghue HD 2014. Insights from paleomicrobiology into the indigenous peoples of pre-colonial America - A Review. 109: 131–139.

Demissie A, Leyten EMS, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiafe P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zumla A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff THM, Andersen P, Doherty TM 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 179–186.

Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori GB, Nienhaus a., Ruhwald M, Wagner D, Zellweger JP, Huitric E,

Sandgren a., Manissero D 2011. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 37: 88–99.

Djoba Siawaya JF, Ruhwald M, Eugen-Olsen J, Walzl G 2007. Correlates for disease progression and prognosis during concurrent HIV/TB infection. *Int. J. Infect. Dis.* 11: 289–299.

Drancourt M 2008. A Single-Step Sequencing Method for the Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Species. 2: 1–8.

Duque-Correa M a, Kuhl a. a, Rodriguez PC, Zedler U, Schommer-Leitner S, Rao M, Weiner J, Hurwitz R, Qualls JE, Kosmiadi G a., Murray PJ, Kaufmann SHE, Reece ST 2014. Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: E4024–E4032.

Encinales L, Zuñiga J, Yunis M, Granados-montiel J, Almeciga I, Clavijo O, Awad C, Collazos V, Inés M, Bañales-mendez JL, Vazquez-castañeda L, Stern JN, Romero V, Frindkis-hareli M, Terreros D, Fernandez-viña M, Yunis EJ, Clara S 2010. Humoral immunity in tuberculin skin test anergy and its role in high-risk persons exposed to active tuberculosis. *Molecular Immunology.* Feb;47(5):1066-1073. NIH Public Access. 47: 1–19.

Eric Crubézy A, Ludesb B, Povedac J-D, Claytond J, Crouau-Royd B, Montagnone D 1998. Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *J. Phys. Th* 321: 941–951.

Esparza M, Palomares B, García T, Espinosa P, Zenteno E, Mancilla R 2015. PstS-1, the 38-kDa mycobacterium tuberculosis glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis. *Scand. J. Immunol.* 81: 46–55.

Ferri AO 2014. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. *Rev. Lib. Novo hamburgo .* V.15: p. 105–212.

Gao C, Yang M, He Z 2012. Characterization of a Novel ArsR-Like Regulator Encoded by Rv2034 in Mycobacterium tuberculosis. 7.

Gerszten E, Allison MJ, Maguire B 2012. Paleopathology in South American Mummies : A Review and New Findings. : 247–256.

Goletti D, Butera O, Vanini V, Lauria FN, Lange C, Franken KLMC, Angeletti C, Ottenhoff THM, Girardi E 2010. Response to Rv2628 latency antigen associates with cured tuberculosis and remote infection. *Eur. Respir. J.* 36: 135–142.

Griffin JE, Gawronski JD, DeJesus M a., Ioerger TR, Akerley BJ, Sasseti CM 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.* 7: 1–9.

Gupta A, akshay kaul, Antony G. Tsolaki S 2012. Mycobacterium tuberculosis: imune ivasion, latency reactivation. *Immunobiology* . 217: 363-374

Gupta S, Bhatia R. Datta K. 1997. Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60-specific immunoglobulins in the sérum Tuber. Lung Dis., 78, pp. 21-27.

Gupta S, Shende N, Bhatia AS, Kumar S, Harinath BC 2005. IgG subclass antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis. *Med. Sci. Monit.* 11: CR585–R588.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* 1: 0055–0061.

Harboe M1 WH 1992. The 38-kDa protein of Mycobacterium tuberculosis: a review. *HIV Infect. gut scarred life?* 166: 874–884.

Herzog H 1998. History of tuberculosis. *Respiration* 1998; 65: 5-15. [Acessado em 11 de nov de 2016]. Disponível em:<http://www.karger.com/Article/PDF/29220>

Hijjar, M. A.; Campos, H. S.; Feitosa, J. V. P. Tuberculose. In: COURA JR 2005. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de janeiro, RJ (Brasil): Ed. Guanabara Koogan.(eds.) Capítulo 1: p. 1395–1433.

Hur Y, Kim A, Kim US, Yeon DK, Kim Y, Lee H 2015. Respostas imunoglobulina IgG de avaliação do Antigen-específicas em tuberculose pulmonar Pacientes e Contactos. *53*: 904–909.

Hussain R, Shiratsuchi H, Ellner JJ, Wallis RS 2000. PPD-specific IgG1 antibody subclass upregulate tumour necrosis factor expression in PPD-stimulated monocytes: possible link with disease pathogenesis in tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 119: 449–455.

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* 65: 298–304.

Kunnath-Velayudhan S, Gennaro ML 2011. Immunodiagnosis of tuberculosis: A dynamic view of biomarker discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* 24: 792–805.

Leyten EMS, Arend SM, Prins C, Cobelens FGJ, Ottenhoff THM, Dissel JT Van 2007. Discrepancy between *Mycobacterium tuberculosis*-specific gamma interferon release assays using short and prolonged in vitro incubation. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 880–885.

Lin PL, Rodgers M, Smith L, Bigbee M, Myers A, Bigbee C, Chiosea I, Capuano S V., Fuhrman C, Klein E, Flynn JL 2009. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect. Immun.* 77: 4631–4642.

Longhi RMP 2013. Fatores de risco associados ao desenvolvimento de tuberculose na população urbana do município de Dourados - MS.

Lowe D1, Higgins R, Zehnder D BD 2013. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol.* 69: 826–832.

Maglione PJ, Chan J 2009. How B cells Shape the Immune Response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 39: 676–686.

Marcos P, Gomes JP 2013. Gênero *Mycobacterium* spp. FAVET-UFRGS. [Acessado em 15 de out de 2015] Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Mycobacterium%204-2013-1.pdf>.

Martinez V, Carcelain G, Badell E, Jouan M, Mauger I, Sellier P, Truffot C, Bricaire F, Arend SM, Ottenhoff T, Autran B, Gicquel B 2007. T-cell and serological responses to Erp, an exported Mycobacterium tuberculosis protein, in tuberculosis patients and healthy individuals. *BMC Infect. Dis.* 7: 83.

Mattos M, Almeida CDS, Franken KLMC, Alves DS, Abramo C, Souza MA De, Hotellier ML, Alves JM, Ferreira AP, Oliveira C, Ottenhoff THM 2010. Increased IgG1, IFN- γ , TNF- α and IL-6 responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with Tuberculosis are lower after chemotherapy. 22: 775–782.

Mattos A, Silva A, Franken KLMC, Figueiredo M, Paula A, Ottenhoff THM 2016. Detection of IgG1 antibodies against Mycobacterium tuberculosis DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy. 96: 65–70.

Mayer G, Hunt R imunologia 2009 – Imunidade mediada por células : Interações célula-célula em respostas imunes específicas. :cap.12 p1–10.

Navoa JJAD, Laal S, Pirofski LL -a. L, McLean GR, Dai Z, Robbins JB, Schneerson R, Casadevall A, Glatman-Freedman A 2003. Specificity and diversity of antibodies to Mycobacterium tuberculosis arabinomannan. *Clin. Vaccine Immunol.* 10: 88–94.

Niemann S, Richter E, Ru S 2016. Biochemical and genetic evidence for the transfer of Mycobacterium tuberculosis subsp . caprae Aranaz et al . 1999 to the species Mycobacterium bovis Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as Mycobacterium bovis subsp . caprae comb . nov . : 433–436.

Nijhawan AE, Iroh P a, Brown LS, Winetsky D, Porsa E 2016. Cost analysis of tuberculin skin test and the QuantiFERON-TB Gold In-tube test for tuberculosis screening in a correctional setting in Dallas, Texas, USA. *BMC Infect. Dis.* 16: 564.

Niki M, Suzukawa M, Akashi S, Nagai H, Ohta K, Inoue M, Niki M, Kaneko Y, Morimoto K, Kurashima A, Kitada S, Matsumoto S, Suzuki K, Hoshino Y 2015. Evaluation of Humoral Immunity to Mycobacterium tuberculosis -Specific Antigens for Correlation with Clinical Status and Effective Vaccine Development. 2015.

Palma C, Spallek R, Piccaro G, Pardini M, Jonas F, Oehlmann W, Singh M, Cassone A 2011. The M. tuberculosis phosphate-binding lipoproteins PstS1 and PstS3 induce

Th1 and Th17 responses that are not associated with protection against *M. tuberculosis* infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011.

Peirs P, Lefèvre P, Boarbi S, Wang XM, Denis O, Braibant M, Pethe K, Locht C, Huygen K, Content J 2005. Mycobacterium tuberculosis with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence. *Infect. Immun.* 73: 1898–1902.

Petronis A, Kennedy JL, Ji K, Genetic PA, Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U 1997. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy Contribution of job control to social gradient in. 350: 1997.

Pieters J 2008. Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host Microbe* 3: 399–407.

Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, Hol WGJ, Sherman DR 2004. Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of Mycobacterium tuberculosis *. 279: 23082–23087.

Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, May YL, Franken KLMC, Ottenhoff THM, Klein MR, Huygen K 2007. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of Mycobacterium tuberculosis in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect. Immun.* 75: 941–949.

Sada, E.; Ruiz-Palacios, G.M.; Lopez-Vidal, Y.; Ponce De Leon, S 1983. Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet.* Sep 17; 2 (8351): 651-2.

Sardela GI 2008. Avaliação dos antígenos MPT-64, MT-10.3, ESAT-6, 16kDa e 38 kDa de Mycobacterium tuberculosis e KIT comercial da Lionex na resposta imune humoral na tuberculose pulmonar e extra pulmonar em área endêmica, Diss. Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro Hospital - Pós Graduação em Clínica Médica – Pneumologia. Rio de Janeiro.

Silva 2012 JS. Imunoglobulinas. Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal Disciplina de Imunologia. Universidade Federal da Bahia Universidade Federal da Bahia. Bahia. 194 :IV 1–20.

Silva RJ, Saad MHF, Féres H 2014. Avaliação da resposta imune celular a antígenos micobacterianos em pacientes com tuberculose coinfectados com parasitos intestinais. Diss. Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro Hospital - Pós Graduação em Clínica Médica – Pneumologia. Rio de Janeiro

Simeão FC dos S, Chimara E, Oliveira RS, Yamauchi JU, Latrilha FO, da Silva Telles MA. 2009 Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: An efficient combined screening test for the presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex on solid media. *J Bras Pneumol*; 35:1212-6.

Singh S, Saraav I, Sharma S 2014. Immunogenic potential of latency associated antigens against Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine* 32: 712–716.

Snapper CM, Marcu KB, Zelazowski P 1997. The Immunoglobulin Class Switch: Beyond “ Accessibility ”. 6: 217–223.

Snapper CM, Mond JJ 1993. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol. Today* 14: 15–17.

Sousa a. O, Henry S, Marója FM, Lee HK, Brum L, Singh M, Lagrange PH, Aucouturier P 1998. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 111: 48–55.

Sundararajan S, Babu S, Das SD 2012. Comparison of localized versus systemic levels of Matrix metalloproteinases (MMPs), its tissue inhibitors (TIMPs) and cytokines in tuberculous and non-tuberculous pleuritis patients. *Hum. Immunol.* 73: 985–991.

Tavares RCO, Salgado J, Moreira VB, Ferreira MAS, Mello FCQ, Leung JW, Fonseca LDS, Spallek R, Singh M, Saad MHF 2007. Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of Mycobacterium tuberculosis in individuals from tuberculosis endemic areas. *Microbiol. Immunol.* 51: 289–296.

Teixeira HC, Abramo C, Munk ME 2007. Artigo de Revisão. *J Bras Pneumol.* 33: 323–334.

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T 2014. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5: 1–17.

World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2013. [Disponível 2016 out 18]. Tuberculosis. Fact sheet No 104. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: WHO; 2016.[Acessado em 9 de nov de 2016]. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

Wisedchaisri G, Chou CJ, Wu M, Roach C, Rice AE, Holmes RK, Beeson C, Hol WGJ 2007. Crystal structures, metal activation, and DNA-binding properties of two-domain IdeR from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 46: 436–447.

Yu Y, Zhang Y, Hu S, Jin D, Chen X, Jin Q, Liu H 2012. Different Patterns of Cytokines and Chemokines Combined with IFN- γ Production Reflect *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Disease. *PLoS One* 7: 1–11.

Yuan R, Casadevall a, Spira G, Scharff MD 1995. Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to *Cryptococcus neoformans* into a protective antibody. *J. Immunol.* 154: 1810–1816.

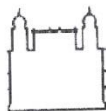
Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C 2011. Evaluation of the GeneXpert MTB / RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. 49: 4138–4141.

Zhang C, Song X, Zhao Y, Zhang H, Zhao S, Mao F, Bai B, Wu S, Shi C 2015. *Mycobacterium tuberculosis* Secreted Proteins As Potential Biomarkers for the Diagnosis of Active Tuberculosis and Latent Tuberculosis Infection. *J. Clin. Lab. Anal.* 29: 375–382.

Zhang. Qing, Isamu Sugawara Qing 2012. Immunology of tuberculosis. *World Journal of Experimental Medicine* 120: 70–74.

9. APÊNDICE E ANEXOS

9.1 Anexo 1 - Aprovação Comitê de Ética



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2010.

Carta: 061/10

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Maria Helena Féres Saad e
- Dra. Elizabeth F. Rangel

Prezadas Senhoras,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **560/10** intitulado **“Mycobacterium tuberculosis: estudo de marcadores imunológicos no prognóstico da TB latente e método molecular em população institucionalizada”** com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

9.2 Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Padrão de reconhecimento em tuberculose, contatos recentes de pacientes tuberculosos e controle da comunidade definido pela produção de IFN- γ no sangue periférico após estímulo de antígenos específicos micobacterianos

Objetivos:

O objetivo deste documento é fornecer informações sobre esta pesquisa. Nele estão os objetivos, procedimentos, benefícios e riscos que podem ocorrer durante o estudo. Você pode não compreender determinadas palavras. Se isto ocorrer, por favor, peça esclarecimentos ao médico responsável pelo estudo. Sua participação neste trabalho é voluntária. Isto significa que você pode se recusar a participar dele, ou deixar de fazer parte dele a qualquer momento, sem que isto modifique o atendimento médico que você tem nesta unidade de saúde.

Introdução/Objetivos:

Você foi chamado para participar deste estudo porque seu médico diagnosticou que você com suspeita de ter tuberculose. (ou porque você é contato de paciente com TB). Por isso, seu médico propôs que você fizesse exame de sangue e no escarro para exames de rotina. Estes exames têm o objetivo de fazer alguns testes diagnósticos (exames) que permitirão descobrir qual é o seu problema e tratá-lo. (Ou sendo você um contato de paciente com TB você pode estar infectado, mas não doente com a bactéria que causa a tuberculose), e nós ainda não compreendemos totalmente esta doença. Assim nós pretendemos fazer alguns testes adicionais no material retirado, e para isto colharemos sangue. Estes testes ainda são experimentais. Partes do sangue serão congeladas para futuros testes, caso você permita. Nós também pretendemos congelar uma parte do sangue que foi retirado para exames de rotina, para futuros testes. Nenhum procedimento será feito apenas para a pesquisa. Nós apenas vamos utilizar uma parte do material colhetado (sangue) para testes adicionais, e congelar uma parte para futuros testes que possam surgir.

Métodos:

Se você concordar em participar do estudo, você será submetido a retirada de sangue feitos de rotina. Nós vamos submeter este material a exames experimentais e vamos congelar uma parte do material. Alguns exames de sangue também serão feitos, em particular, o exame do HIV, caso você autorize. Nós também pediremos que você responda a algumas perguntas e que nos autorize a olhar alguns dados médicos no seu prontuário. Você também será submetido a uma prova tuberculínica, que é um teste feito com uma injeção na pele que provoca uma pequena reação local. O tamanho desta reação será medido e pode ter implicações no seu diagnóstico. Este também é um procedimento rotineiro e não da pesquisa.

Riscos e desconfortos:

Os exames de sangue que você vai fazer podem causar algum incômodo como dor leve pela introdução da agulha para a coleta ou infecção no local onde a agulha entra na veia, mas isto é raro. Estas possíveis complicações e desconfortos não decorrem da pesquisa, e sim dos procedimentos aos quais você precisa se submeter para saber mais sobre a sua doença.

Benefícios potenciais:

Sua participação nesta pesquisa pode nos ajudar a saber mais sobre esta doença e como a diagnosticar melhor. Se com este estudo obtivermos informações importantes sobre a sua saúde, notificaremos você e seu médico. De qualquer forma, participar do estudo não traz benefícios diretos para você no momento, apenas permite saber um pouco mais sobre esta doença.

Custos e /ou pagamento por participar do estudo:

Não há custos para você participar do estudo. Você não terá que pagar pelo tratamento ou por qualquer consulta ou exame que façam parte do estudo. Você também não receberá qualquer quantia por participar.

Confidencialidade (privacidade dos dados):

Seus dados poderão ser revistos por mais de 15 anos pela equipe envolvida no estudo, apenas com o objetivo de recuperar informações relativas à pesquisa. O material congelado ficará armazenado por mais de 5 anos e poderá ser utilizados em outros sistemas de investigação. Os resultados do estudo serão publicados, mas seu nome não será revelado em nenhuma publicação. Todas as informações são confidenciais.

As informações obtidas com os testes serão direcionadas à equipe envolvida na pesquisa, que vai mantê-las trancadas em um armário com cadeado. No Brasil, as autoridades sanitárias devem ser informadas (notificação compulsória) de todo o caso de tuberculose. Se o seu diagnóstico for tuberculose, seu médico deverá informar isso às autoridades de saúde (mesmo que você não participe do estudo). O comitê de ética em pesquisa também deverá ser informado caso você tenha algum problema com o procedimento.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Isto significa que é escolha sua participar ou não. Se você optar por não participar, isto não vai influenciar em nada no seu tratamento ou no seu acompanhamento médico. Seu médico vai tratar você com o tratamento padrão e acompanhar você no futuro. Se você optar por participar, você poderá mudar de idéia a qualquer momento e sair do estudo sem nenhum prejuízo para seu tratamento. Nesta situação, você também será tratado da forma usual. Seu médico também pode tirar você do estudo caso considere que isto será melhor para você. Seu médico ou eu discutiremos isso com você.

Direitos legais:

Se ocorrer qualquer problema você terá atendimento médico de emergência – você continua tendo todos os seus direitos como qualquer outro paciente da unidade. Você não está abrindo mão de nenhum dos seus direitos participando da pesquisa ou assinando este documento.

Pessoas que podem ser contatadas: Se você tiver qualquer dúvida a respeito desta pesquisa pode contatar o seu médico que lhe atendeu. Os telefones (abaixo) estarão à sua disposição para casos de emergência. Uma cópia deste termo de consentimento ficará anexada aos seus dados e você receberá uma cópia para guardar.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Eu compreendi que este é um trabalho de pesquisa.
2. Eu li todas as páginas deste termo de consentimento. A equipe envolvida na pesquisa me deu todas as informações a respeito dos procedimentos do trabalho. Tive a oportunidade de fazer perguntas, e minhas perguntas foram respondidas de forma satisfatória. Foi-me dado tempo suficiente para considerar com atenção as informações recebidas e decidir participar ou não do estudo.
3. Fui devidamente informado que minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e que eu posso me recusar a participar ou decidir deixar o estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de prejuízo ao meu acompanhamento médico.
4. Eu autorizo que meus dados sejam revelados à equipe envolvida na pesquisa, bem como às autoridades sanitárias e ao comitê de ética responsável pela aprovação deste projeto, apenas para finalidades relativas ao estudo. Esta autorização é válida por um período de 15 anos.
5. Eu autorizo que o material coletado seja armazenado por um período de mais de 5 anos para fins de pesquisa.
7. Eu compreendi que vou receber um a cópia deste termo para guardar comigo depois de assinada.
8. Eu compreendi que não estou abrindo mão de meus direitos legais ao assinar este termo. Minha assinatura abaixo indica que, de forma voluntária, concordo em participar deste estudo.

Participante:

(Assinatura)

(Nome)

Tel

Entrevistador:

(Assinatura)

(Nome)

Tel.

Data: _____

Investigador principal: Fernanda C. Q. Mello, Profa. Adjunta da Faculdade de Medicina, Instituto de Doenças do Tórax – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho , UFRJ. Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco, 255, sexto andar, Cidade Universitária – Ilha do Fundão, RJ. Tel. 21 25622402. Maria Helena Féres Saad, Lab. Microbiologia Celular, IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil 4363- Pav. de Hanseníase, Tel. 25984346 .