

UNIVERSIDADE DE UBERABA

ELLEN MARQUES FREITAS ABUD

**ELEVADOS NÍVEIS DE IL-17 NA INFECÇÃO ATIVA DA TUBERCULOSE
ASSOCIADOS COM ALTERAÇÕES NOS EXAMES RADIOLÓGICOS APÓS A
CURA CLÍNICA**

Uberaba-MG

2019

ELLEN MARQUES FREITAS ABUD

**ELEVADOS NÍVEIS DE IL-17 NA INFECÇÃO ATIVA DA TUBERCULOSE
ASSOCIADOS COM ALTERAÇÕES NOS EXAMES RADIOLÓGICOS APÓS A
CURA CLÍNICA**

Dissertação apresentada a Universidade de Uberaba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Biopatologia.

Orientadora: Prof.Dra.Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Uberaba- MG

2019

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

A92e Abud, Ellen Marques Freitas.
Elevados níveis de IL-17 na infecção ativa da tuberculose associados com alterações nos exames radiológicos após a cura clínica / Ellen Marques Freitas Abud. – Uberaba, 2019.
48 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Biopatologia.
Orientadora: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

1. Tuberculose. 2. Citocinas. 3. Tomografia computadorizada. I. Rodrigues, Denise Bertulucci Rocha. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Biopatologia. III. Título.

CDD 616.995

ELLEN MARQUES FREITAS ABUD

“ELEVADOS NÍVEIS DE IL-17 NA INFECÇÃO ATIVA DA TUBERCULOSE ASSOCIADOS COM ALTERAÇÕES NOS EXAMES RADIOLÓGICOS APÓS A CURA CLÍNICA”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

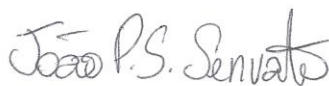
Área de concentração: BIOPATOLOGIA

Aprovado (a) em: 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues
Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. João Paulo Silva Servato
Universidade de Uberaba



Prof^a. Dr^a. Cristina da Cunha Hueb B. de Oliveira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Acima de tudo, agradeço a Deus por mais uma realização.

Dedico a minha família, as amigas Isadora (aluna da iniciação científica), Michele e Keysy (colegas do mestrado). À professora Denise e ao professor Virmondes, por toda a colaboração e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa que durante a fase inicial, há liberação de citocinas e quimiocinas que ajudam a recrutar monócitos, células T e B e neutrófilos para os locais de infecção. As células Th17 também têm sido associadas à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, e acredita-se que níveis elevados de IL-17 exacerbam a inflamação, aumentando o recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente, aumentando o dano tecidual. **OBJETIVOS:** No presente estudo, foram realizados estudos de imagem (radiografia e tomografia computadorizada de tórax) e analisadas as alterações pulmonares de pacientes com tuberculose tratada e sua associação com níveis de IL-17, linfotóxina- α , TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10, produzidas por células do sangue periférico (PBMC), após estímulo com antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Este trabalho é um estudo prospectivo. Vinte e um pacientes incluídos em estudo anterior, onde foi analisado os níveis de citocinas produzidas por células do sangue periférico (PBMC), no período de 2012 a 2016 foram convidados a participar dessa etapa. As citocinas foram analisadas por ELISA. Os pacientes que aceitaram participar novamente do estudo, foram encaminhados para exame de Rx e tomografia computadorizada de tórax. As alterações dos exames por imagem foram quantificadas em escores estabelecidos pela intensidade e distribuição. **RESULTADOS:** As lesões sequelares mais frequentes observadas à TC foram as bronquiectasias, reticulações, faixas de atelectasias e nódulos subcentimétricos/pequenos nódulos calcificados ou não. Constatou-se que níveis elevados de IL-17 na infecção ativa da tuberculose estão associados com escores mais elevados das lesões pulmonares observados à TC. Os níveis de linfotóxicas, TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10 não estão associados com escores de maior gravidade, observados aos exames de Rx e TC. **CONCLUSÃO:** O RX e a TC de tórax são importantes na detecção de sequelas no manejo clínico da tuberculose pulmonar crônica e níveis elevados de IL-17 na infecção ativa da tuberculose estão associados com lesões pulmonares de maior gravidade, após a cura clínica, quando analisados nos exames de TC.

Palavra-chave: tuberculose, citocinas, quimiocinas, IL-17, lesões sequelares tomográficas

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis is an infectious-contagious disease that during the initial phase, there is release of cytokines and chemokines that help to recruit monocytes, T and B cells and neutrophils to the infection sites. Th17 cells have also been associated with Mycobacterium tuberculosis infection, and elevated levels of IL-17 are believed to exacerbate inflammation, increasing neutrophil recruitment and thereby increasing tissue damage. **OBJECTIVES:** In the present study, imaging studies (chest x-ray and computed tomography) were performed, and the pulmonary alterations of patients with treated tuberculosis and their association with IL-17, lymphotoxin- α , TNF- α , IFN- γ , IL-12 and IL-10, produced by peripheral blood cells (PBMC) after stimulation with Mycobacterium tuberculosis antigens. **MATERIAL AND METHODS** This is a prospective study. Twenty one patients included in a previous study, where we analyzed the levels of cytokines produced by peripheral blood cells (PBMC), from 2012 to 2016 were invited to participate in this stage. Cytokines were analyzed by ELISA. The patients who agreed to participate again in the study were referred for Rx and chest computed tomography. **RESULTS:** The most frequent sequelae lesions observed at CT were bronchiectasis, cross-links, atelectasis bands and subcentimetric nodules / small calcified nodules or not. It has been found that elevated levels of IL-17 in active tuberculosis infection are associated with higher lung lesion scores observed at CT. The levels of lymphotoxins, TNF- α , IFN- γ , IL-12 and IL-10 are not associated with higher severity scores observed on the Rx and CT scans. **CONCLUSION:** RX and chest CT are important in the detection of sequelae in clinical management of chronic pulmonary tuberculosis and elevated levels of IL-17 in active tuberculosis infection are associated with more severe pulmonary lesions after clinical cure when analyzed on CT scans.

Key words: tuberculosis, cytokines, chemokines, IL-17, tomographic sequelae lesions

SUMÁRIO

1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	11
2. HIPÓTESE	16
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1.OBJETIVO GERAL	18
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5.FORMATAÇÃO	19
6. ARTIGO	20
REFERENCES.....	11

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação das alterações radiológicas 29
- Figura 2** Níveis de citocina IL-17 e Linfotoxina (pg/ml) obtidos de sobrenadantes de cultura PBMC em condições de estímulo com antígenos de *M. tuberculosis* e comparados com os escores de maior ou menor gravidade na TC e no RX 31
- Figura 3** Comparação entre os escores das lesões pulmonares predominantes com os níveis de IL-17 32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Distribuição das lesões observadas nos exames radiológicos por TC, de acordo com sua incidência 27
- Tabela 2** Distribuição das lesões observadas nos exames radiológicos por RX, de acordo com sua incidência 28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CXCL10	Quimiocina CXCL10
CXCL11	Quimiocina CXCL11
CXCL9	Quimiocina CXCL9
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina-6
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
IP-10	Proteína indutora de Interferon 10
LT- α	Linfotoxina alfa
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MDR-TB	Tuberculose multidrogas resistente
MIP-1 α e β	Proteína Inflamatória dos macrófagos 1 alfa e beta
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Postero-anterior
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
RANTES (ou CCL5)	Proteína secretada e regulada pela Ativação de Linfócito T
RX	Radiografia
TB	Tuberculose
TC	Tomografia computadorizada
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Linfócitos T helper (auxiliar) do padrão 1
Th17	Linfócitos Thelper (auxiliar) do padrão 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

A tuberculose (TB) é uma doença ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis* sendo um importante problema de saúde global. Provoca problemas de saúde para aproximadamente 10 milhões de pessoas a cada ano e é a nona principal causa de morte no mundo. É a principal causa de um único agente infeccioso, ficando acima do HIV/AIDS. Em 2016, estima-se que 1,3 milhões de mortes por tuberculose, entre pessoas soronegativas (contra 1,7 milhões em 2000), e mais 374.000 mortes, entre pessoas HIV-positivas (WHO, 2016).

A estimativa global tem sido ascendente nos últimos anos, devido ao surgimento de bacilos resistentes a drogas, o que representa um grande desafio para a terapia. Estima-se que 340.000 casos de MDR-TB (Tuberculose multidrogas resistente), entre pacientes com TB pulmonar, foram relatados em 2015, e 21,5% de casos de incidência de MDR-TB (WHO, 2016).

No Brasil, foram notificados 82.676 casos novos de tuberculose em 2016, sendo que 87% dos casos correspondem à forma pulmonar (WHO, 2018). Em Minas Gérias foram notificados 4.039 casos de tuberculose com 212 óbitos, em 2016 houve 3.552 novos casos da doença no estado (SINAN, 2014).

A pobreza, desnutrição e tabagismo estão intimamente associadas à TB. O fumo ativo é significativamente associado à tuberculose recorrente e mortes por tuberculose. Estes efeitos aparecem, independentemente dos efeitos do uso do álcool, status socioeconômico e outros potenciais confundidores (WHO, 2018).

O pulmão é o órgão mais acometido, no entanto a tuberculose pode envolver qualquer um dos vários sistemas de órgãos, como, por exemplo, o sistema respiratório, cardíaco, nervoso central, musculoesquelético, gastrointestinal e genitourinário. O diagnóstico oportuno da doença é primordial, pois o tratamento tardio está associado à morbidade grave (BURRIL et al, 2007).

A forma de transmissão de *M. tuberculosis* ocorre pela inalação de bacilos contidos em gotículas, eliminadas pela expectoração de indivíduos com doença em atividade (LAVAREVIC e FLYNN, 2002). Após a inalação, os bacilos contidos nas gotículas atingem os alvéolos pulmonares distais, onde se multiplicam no interior de macrófagos, estabelecendo assim a infecção. A partir deste momento, a doença pode agir de várias formas, ditadas pelo balanço entre microorganismos e sistema imune do hospedeiro. Em cerca de 90 a 95% dos casos, a infecção por *M.*

tuberculosis ocorre de forma assintomática e não transmissível, sendo denominada tuberculose latente. Dentre os infectados pelo *M. tuberculosis*, somente 5 a 10% desenvolvem doença ativa, em algum momento de suas vidas (HARTMAN-ADAMS et al, 2014).

A tuberculose é uma doença infecciosa que durante a fase inicial, os macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* secretam citocinas pró-inflamatórias, como, interleucina-1(IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como quimiocinas que ajudam a recrutar monócitos, células T e B e neutrófilos para os locais de infecção. As células recrutadas formam granulomas, um conjunto organizado de células inflamatórias, compostos de macrófagos localizados centralmente, circundados por linfócitos T e B. A formação de tais estruturas organizadas ajuda a conter e prevenir a disseminação da infecção e também permite o contato próximo entre células T e macrófagos, necessário para a indução de mecanismos antimicrobianos efetivos (LAVAREVIC e FLYNN, 2002).

As células T CD8+ têm o potencial de afetar a imunidade antimicrobiana de várias maneiras. Essas células podem funcionar como fonte de citocinas do tipo 1, como interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α , ou podem exercer seu efeito protetor, matando macrófagos infectados dentro dos tecidos. O IFN- γ e o TNF- α são importantes para a ativação de macrófagos e consequentemente ativando mecanismos microbicidas dessa célula, levando a destruição das micobactérias (LAVAREVIC e FLYNN, 2002). O IFN- γ é fundamental na limitação da infecção *M. tuberculosis*. Estudos mostram que a vacinação desencadeou uma resposta acelerada do IFN- γ pelas células T CD4+ no pulmão, durante a infecção subsequente pelo *M. tuberculosis* (KHADER et al, 2007). Entretanto, dados recentes sustentam um novo subconjunto de células Th CD4+, Th17 que produzem IL-17 citocina fundamentalmente pró-inflamatória, que atua no recrutamento de neutrófilos ao sítio infeccioso, tanto pela indução da produção de IL-8 quanto de GM-CSF e podem contribuir para a inflamação (ROMANO et al, 2006). Para o estabelecimento dessa população de células T CD4+, produtora de IL-17 no pulmão, é necessário a produção de IL-23, que tem sido associada no aumento do processo inflamatório e contribuir para a cessação precoce do crescimento bacteriano. Associada a produção de IL-23 foi encontrado ainda a expressão de quimiocinas CXCL9,

CXCL10 e CXCL11. Notou-se que, após o contato com o *M. tuberculosis*, houve uma depleção de IL-17 que reduziu a expressão de quimiocinas e promoveu um acúmulo de células T CD4+, produtoras de IFN- γ no pulmão. Foi proposto que a vacinação induz células T CD4+, produtoras de IL-17, que povoam o pulmão, e que, após o contato com o *M. tuberculosis*, desencadeiam a produção de quimiocinas que recrutam células T CD4+, produtoras de IFN- γ , as quais, em última análise, restringem o crescimento bacteriano (KHADER et al, 2007).

Desta forma, os linfócitos Th1 são cruciais na resposta imune contra o *M. tuberculosis*, no entanto, o IFN- γ sozinho não é suficiente para a completa erradicação da bactéria, sugerindo que outras citocinas podem ser necessárias para a remoção do patógeno. As respostas celulares precoces ao *M. tuberculosis* induzem a produção de IL-17, contribuindo para a formação de granuloma e controle do crescimento bacteriano. No entanto, níveis excessivos de IL-17 exacerbaram a inflamação, aumentando o recrutamento de neutrófilos e o dano tecidual. Estudos mostram que a razão de antígeno expandido e linfócitos TCD4+, IFN- γ e IL-17, no sangue periférico e no líquido pleural de pacientes com TB, foi correlacionado diretamente com os parâmetros clínicos associados à gravidade da doença, em indivíduos com lesões pulmonares mais graves e com maior tempo de evolução da doença (JURADO et al, 2012).

A radiografia de tórax continua sendo base do diagnóstico de tuberculose e desempenha um papel importante na triagem, diagnóstico e resposta ao tratamento de pacientes com TB. No entanto, as radiografias podem ser normais ou mostrar apenas achados leves ou inespecíficos, em pacientes com doença ativa (em até 15%). Normalmente, uma única incidência em pósterio-anterior (PA) é suficiente (HARINSINGHANI et al, 2000; NACHIAPPAN et al, 2017; JEONG e LEE, 2007).

A tomografia computadorizada de tórax (TC) é mais sensível que a radiografia de tórax, na detecção e caracterização, tanto da doença parenquimatosa sutil localizada ou disseminada, quanto da linfonodopatia mediastinal (HARINSINGHANI et al, 2000; NACHIAPPAN et al, 2017; JEONG e LEE, 2007).

Estudos mostram que com a TC, o diagnóstico de TB pulmonar está correto em 91% dos pacientes sendo corretamente excluída em 76% dos pacientes. A TC de alta resolução é particularmente útil na detecção de pequenos focos de cavitação, em áreas de pneumonia confluyente e em áreas de modularidade densa e cicatrizes. Num estudo de 41 pacientes com TB ativa, a TC de alta resolução

mostrou cavidades em 58% dos casos, enquanto as radiografias de tórax mostraram cavidades em apenas 22%. Além do diagnóstico de TB, a TC de alta resolução é útil na determinação da atividade da doença. A TC também é útil na avaliação de complicações pleurais, incluindo derrame pleural, empiema e fístula broncopleural, e pode mostrar doença pleural que não é evidente na radiografia de tórax (JEONG e LEE, 2007). Os pacientes que desenvolvem doença após a exposição inicial são considerados portadores de TB primária, enquanto os pacientes que desenvolvem a doença como resultado da reativação de um foco anterior de TB são considerados portadores de TB reativa. Tradicionalmente, acreditava-se que as manifestações clínicas, patológicas e radiológicas da reativação da TB eram bem distintas daquelas da TB primária. Este conceito foi recentemente desafiado, com base no DNA da bactéria. Um estudo da genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* com polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) mostrou que as características radiográficas são frequentemente semelhantes, em pacientes que aparentemente têm uma doença primária e nos que têm uma TB de reativação (NACHIAPPAN et al, 2017; JEONG e LEE, 2007).

Portanto, o tempo desde a aquisição da infecção até o desenvolvimento da doença clínica não prediz, de maneira confiável, a aparência radiográfica da TB. O único preditor independente de aparência radiográfica pode ser a integridade da resposta imune do hospedeiro, ou seja, pacientes gravemente imunocomprometidos mostram uma tendência a ter a forma primária de TB, enquanto pacientes imunocompetentes tendem a ter a forma de reativação (JEONG e LEE, 2007). A tuberculose latente é um termo um pouco amplo que, do ponto de vista clínico, pode abranger a tuberculose latente e a tuberculose prévia. Este termo refere-se a achados positivos, em testes de triagem laboratorial, na ausência de evidência radiográfica ou clínica de doença ativa. Por definição, a doença prévia (inativa) demonstra evidência radiográfica ou clínica de tuberculose prévia, mas nenhuma evidência de tuberculose atualmente ativa (NACHIAPPAN et al, 2017).

Estudos comprovam que as aparências de imagem da MDR-TB são as mesmas que as da tuberculose não-MDR, uma vez que a tuberculose MDR não é mais infectiva do que a tuberculose normal. No entanto, é uma infecção mais grave, exigindo administração prolongada de drogas de segunda linha, mais tóxicas, associadas a taxas mais elevadas de morbidade e mortalidade. Os pacientes permanecem infecciosos durante um período mais longo, depois do tratamento

iniciado, o que fornece um maior risco de infecção para outras pessoas (BURRIL et al, 2007).

As características clínicas e radiológicas da tuberculose podem imitar as de muitas outras doenças. Um alto grau de suspeita é necessário, especialmente em populações de alto risco. Embora em muitos casos ainda sejam necessárias amostras de biópsia ou cultura, para produzir o diagnóstico definitivo (BURRIL et al, 2007).

Assim, uma avaliação dos componentes celulares do sistema imune e das principais citocinas envolvidas na doença ativa e após sua cura clínica pode sugerir se esta é acompanhada por uma “viragem” do sistema imune para um perfil relacionado com resistência à infecção, e se esta mudança é imediata ou tardia. Da mesma forma, a comparação do perfil de resposta imune entre estes dois momentos também pode indicar quais células e citocinas estão relacionadas com a doença ativa e quais estão relacionadas com a manutenção da cura clínica do paciente. Assim, é importante conhecer como o sistema imune pode estar influenciando nas lesões teciduais causadas durante a fase ativa da doença, através dos exames de imagem que poderão colaborar não só para os radiologistas, mas também para os médicos clínicos, o espectro de características por exame de imagem da tuberculose após a cura da doença.

2. HIPÓTESE

Elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias na infecção ativa da tuberculose estão associados com alterações fibrocicatriciais nos exames radiológicos após a cura clínica.

3. JUSTIFICATIVA

A erradicação da tuberculose parece ser uma meta ainda distante de ser alcançada. O tratamento é lento e utiliza medicamentos criados na década de 60. Recentemente surgiram novos medicamentos, como por exemplo, o Bedaquilin, que proporciona um tratamento mais rápido, ainda não disponível no Brasil. Sendo assim, é notória a necessidade de estudos relacionados a novos medicamentos, bem como no desenvolvimento de medicações que proporcionam menores sequelas pulmonares.

Considerando a atual conjuntura, é necessário ampliar o conhecimento entre a relação das citocinas com as sequelas pulmonares detectadas pelos estudos de imagem, para que possam ser aplicadas na clínica médica. E por isso, a importância de avaliar e associar os níveis de citocinas com as alterações observadas nos exames de imagens radiológicas de pulmão de pacientes com tuberculose tratada.

4. OBJETIVOS

4.1.OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações pulmonares por estudos radiológicos (radiografia e tomografia computadorizada de tórax) em pacientes com tuberculose tratada e sua associação com níveis de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), após estímulo com antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os níveis de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-12, linfotóxina- α , IL-17 e IL-10) em pacientes com doença ativa.
2. Analisar imagens através de radiografia e tomografia computadorizada de tórax, determinando a existência e a extensão de alterações características de doença em pacientes tratados sem sinais de doença reativa.
3. Associar os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-12, linfotóxina- α , IL-17 e IL-10 com as alterações nas imagens radiológicas de pulmão de pacientes com tuberculose tratada.

5.FORMATAÇÃO

O trabalho seguiu as normas da ABNT, assim como as normas de formatação estabelecidas pelo curso de mestrado acadêmico em odontologia da Universidade de Uberaba.

O artigo seguiu as normas de formatação da revista Journal of Immunology Research.

6. ARTIGO

HIGH LEVELS OF IL-17 IN TUBERCULOSIS ACTIVE INFECTION ASSOCIATED WITH CHANGES IN RADIOLOGICAL TESTS AFTER CLINICAL HEALING

Ellen Marques Freitas Abud ^a, Djalma Alexandre ^b, Marcos Vinicius da Silva^b, Isadora Hueb Barata de Oliveira^a, Helder de Souza Lima e Silva^b, Virmondos Rodrigues^b, Denise Bertulucci Rocha Rodrigues^{a,b}

^a Laboratory of Biopathology and Molecular Biology, University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil

^b Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil

* Correspondence

Denise Bertulucci Rocha Rodrigues. Universidade de Uberaba, Av. Nenê Sabino, 1801, Bairro Universitário, CEP 38.055-500, Uberaba MG, Brazil, Telephone: +55 34 3319 8815, Fax: +55 34 3314 8910, E-mail: denise.rodrigues@uniube.br

Acknowledgements

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Rede Mineira de Doenças Infecciosas, Universidade de Uberaba (UNIUBE) and CEFORES-UFTM, for financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests regarding the publication of this paper.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a disease caused by *M. tuberculosis*, which has existed for centuries and remains a major global health problem. It causes health hazards to approximately 10 million people each year and is the ninth leading cause of death in the world (1).

In the present study, the cytokine and cytokine release of IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1, RANTES, IP-10 and MIP-1 α and β , which, in turn, attract to the infectious site, monocytes and precursors of dendritic cells (14). The protective immune response against *M. tuberculosis* depends on the interaction between infected cells and CD4 + T cells (15) (16). Th1 lymphocytes are crucial in the immune response against *M. tuberculosis*, the production of IFN- γ , lymphotoxin- α (LT) and TNF- α , which are fundamental in the formation and maintenance of granulomas as well as disease control (17, 18). However, according to some authors, it is believed that IFN- γ alone is not sufficient for complete eradication of the bacterium, suggesting that other cytokines may be necessary for the elimination of this mycobacteria (19) (20).

The population of Th17 lymphocytes in tuberculosis has not yet clearly defined its role. Some authors suggest that the effects of IL-17 on primary infection by *M. tuberculosis* do not appear to provide protection against infection (21). During the chronic phase, a balance between Th1 and Th17 responses needs to be achieved, to control bacterial growth and limit tissue damage, because an increase in IL-17 promotes neutrophil recruitment and, consequently, tissue damage (22) (23). It is suggested that increased neutrophils in lung tissue may further stimulate the differentiation of Th1 responses by the release of IL-12.

Elevated levels of IFN- γ and IL-17, obtained from peripheral blood mononuclear cells and pleural fluid of patients with pulmonary TB, were associated with the severity and duration of disease progression (12).

On the other hand, some cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor beta (TGF- β) may modulate the intensity of the inflammatory process. IL-10 is recognized for its potential in limiting the production of IFN- γ , although IL-10 also appears to play this role under IL-17 but to a lesser extent (24) (25).

Chest radiography continues to be important for the diagnosis of tuberculosis and plays an important role in the screening and therapeutic response of patients with TB. However, radiographs may be normal or display only mild or nonspecific findings in up to 15% of patients with active disease, and a single incidence in posteroanterior (BP) is sufficient for diagnosis (9) (6) (7). Computed tomography of the chest is more sensitive than chest X-ray in the detection and characterization of subtle localized or disseminated parenchymal disease and mediastinal lymph node disease (9) (6) (7).

Studies reveal that the diagnosis of pulmonary TB in CT is effective in 91% of patients, particularly in the detection of small foci of cavitation, in areas of confluent pneumonia and areas of dense modularity and scarring (7). The cicatricial changes of tuberculosis can be observed in RX and CT. CT scans are better defined as including stable fibronodular changes, scarring (peribronchial fibrosis, bronchiectasis, and architectural distortions) as well as apical nodular opacities and upper pulmonary zones (7). The fibronodular alteration is associated with a considerably greater risk of developing reactivation of tuberculosis (7). In contrast, calcified granulomas and calcified lymph nodes are associated with an extremely low risk of reactivation (6). The cicatricial changes are due to the reaction of the organism to lesions caused during the active infection, motivated by the presence of *M. tuberculosis* and the immune and inflammatory reaction due to the infection (6). The first cells of the immune system to interact with *M. tuberculosis* are alveolar phagocytes, which can often destroy these mycobacteria using their microbicidal capacity (13).

In the present study, the pulmonary alterations were analyzed by radiological studies (radiography and computed tomography of the chest) in patients with treated tuberculosis and its association with levels of IL-17, lymphotoxin- α , TNF- α , IFN- γ , IL-12 and IL-10 produced by peripheral blood cells (PBMC) after stimulation with antigen *M. tuberculosis*.

MATERIAL AND METHODS

Approval of the Ethics Committee

The work was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of the Triângulo Mineiro (UFTM), under protocol no. 65821716.5.0000.5154 (ANNEX V)

Patients

Between 2012 and 2016, 40 patients were selected from the Maria da Glória health clinic, with active pulmonary tuberculosis, diagnosed by bacilloscopy or culture, and the collection of blood in the acute phase of the disease was conducted with the study of cytokines produced by blood cells (PBMC) after stimulation with M. tuberculosis antigens. In 2018, only 21 of these patients who fulfilled the inclusion criteria were again invited to participate in imaging exams (chest X-ray and CT).

In all cases, the diagnosis of TB was defined through clinical, radiographic and laboratory criteria, and it was performed by the team of the Municipal Secretary of Health-Uberaba / MG, responsible for the care of patients with TB.

ANALYSIS OF BLOOD COLLECTED DURING ACUTE ILLNESS

• THE PERIFERIC BLOOD MONONUCLEAR CELLS – PBMCs

These tests were performed in a previous stage to the study of images. Cells were separated by density gradient using the Ficoll-Hypaque technique (PHARMACY-SWEDEN). Approximately 30 ml of blood was placed in 10 ml of a Ficoll-Hypaque solution in Falcon 50 ml conical plastic tubes (SARSTEDT-USA). The tubes were centrifuged at 400XG for 30 minutes at 21°C. The cell ring formed between Ficoll and plasma was collected and transferred to another 50 ml Falcon-type tube (SARSTEDT-USA). The excess Ficoll was removed by washing the cells 3 times with 10 ml of incomplete RPMI medium (GIBCO-USA) by centrifugation at 200XG for 10 minutes at 21°C. The amount of cells was determined by counting in Neubauer's chamber, and the sample was adjusted with complete RPMI medium, containing 25 mM Hepes (GIBCO-USA), 10% inactivated fetal bovine serum (EUROBIO-FRANCE), 2 mM L-glutamine (GIBCO-USA), 40 µg / ml gentamicin (ARISTON-BRASIL), 1 mL 2β -mercaptoethanol (MERCK-Schuchardt), 2g sodium

bicarbonate (MERCK), to give a final concentration of 1×10^6 / ml. All procedures were performed under sterile conditions using a laminar flow hood.

• **OBTAINING BCG ANTIGENS**

M. Samples of *M. bovi* (Calmette-Guérin Bacillus – BCG) and Moreau Rio de Janeiro strain—obtained through the IMUNOBCG lyophilized® Kit (INSTITUTO BUTANTAN-BRASIL)—were used for the extraction of antigens. The mycobacteria were resuspended in 0.85% physiological solution, according to the manufacturer's protocol – 12 vials, 1 ml per vial, containing 40 mg of BCG, corresponding to about 2 million viable bacilli per mg. The resuspended bacilli were kept in the original vials and incubated in a water bath for 30 minutes at 90°C. Afterwards, they were autoclaved for 30 minutes. The contents of the vials were transferred to a 15 ml Falcon (SARSTEDT-USA) tube and centrifuged at 400XG for 30 minutes at 20°C. The protein portion of the supernatant was collected by filtering on a 0.22 µm (MILLIPORE-USA) filter, aliquoted and stored at -20°C in Eppendorf tubes (50 µL per Eppendorf). An aliquot was collected and used for protein concentration assay using the Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD), according to the manufacturer's protocol.

• **CULTIVATION OF PBMCs AS PREVIOUSLY DESCRIBED (26)**

Cultures for granuloma formation assays were performed on a 24-well culture plate (FALCON-BD-USA). 500 µL of the resuspension of PBMC obtained from the study patients and 500 µL of complete medium were added to these plates, thus obtaining 1×10^6 cells/mL. 1 µL of the Beads that were conjugated above were added in these cultures, which corresponded to approximately 100 Beads. Cultures of 14 days were carried out, maintained at 37°C, in humid air containing 5% CO₂.

• **QUANTIFICATION OF CYTOKINES IN THE SURROUNDINGS OF CULTURES**

The cytokines—IL-10, IFN-γ, IL-12, TNF-α (BD PHARMINGEN-USA), Lymphotoxins and IL-17 (R & D-USA)—present in the culture supernatants were quantified by the ELISA method. High-affinity 96-well plates (NUNC-DENMARK) were sensitized with monoclonal antibodies specific for each cytokine, 50 µL per well, in a concentration of 1 mg/ml, in sensitization buffer (pH 9.5), incubated overnight (overnight) at 4°C. After incubation, the contents were discarded and the

plates were blocked with PBS, containing 2% bovine albumin (SIGMA-USA), 200µL per well, 4 hours at room temperature. Then, PBS-BSA was discarded, and in rows 1 to 10, samples diluted 1: 2 in 1% PBS-BSA, with final volume of 100µl per well, were added. In ranks 11 and 12, dosages of the recombinant cytokines were performed, following a serial dilution of 1: 2 in 1% PBS-BSA, with final volume 100 µL, the initial concentration being recommended by the manufacturer of each recombinant cytokine. Wells H11 and H12 were used as WHITE, and only 100 µL of 1% PBS-BSA was added. Plates were incubated overnight (overnight) at 4°C. Then, the plates were washed with PBS solution containing 0.05 TWEEN (SIGMA-USA), and then biotin-conjugated cytokine-specific developmental antibodies were added, all from the same manufacturer of the respective sensitizing antibody, at the concentration of 1 mg/ml in 1% PBS-BSA, 80µL per well. After incubation for 4 hours at 37°C, the plates were again washed with 0.05% PBS-TWEEN, adding 80 µl of alkaline phosphatase-conjugated streptoavidin per well and incubated for 3 hours at 37°C. Finally, the plates were washed again in 0.05% PBS-TWEEN and the development buffer containing p-di-nitrophenyl-phosphate (SIGMA-USA), 80µL per well, was added and reacted under at room temperature. The results were obtained from the measurement of absorbances, in length of 450nm waveforms, which were obtained in automatic ELISA reader (EnSpire-PerkinElmer). The concentration of the cytokines was determined from linear regression with the absorbances obtained in the curve of the recombinant cytokines and expressed in pg/ml.

Radiographic analysis

The patients were submitted to a scanning chest X-ray, in the posteroanterior study, and a high-resolution MultiSlice chest tomography in a 32-channel Phillips device (DFOV: 500; cut thickness: 0.75 mm). The exams were performed at the Mário Palmério University Hospital. Radiographic and tomographic signs suggestive of cicatricial tuberculosis were thin or thick-walled cavities, bronchiectasis, atelectasis bands, subsegmental atelectasis, reticulations, opacities, cysts, hyperinsufflation/emphysema, ground-glass opacities, mucocoeles, bronchial atresia, well-defined small nodules or calcified or not calcified, pleural thickening or calcifications, centrilobular nodules and calcified mediastinal/hilar lymph nodes. Two observing radiologists analyzed the images.

A semiquantitative analysis was used, through scores, to determine the extent of the lesions, considering the following:

Score 0: No pulmonary involvement;

Score 1: Lesions affecting only one lobe of one lung;

Score 2: Lesions affecting more than one lobe from the same lung; and

Score 3: Lesions affecting both lungs.

From the individual score, the sum of each score was obtained to determine the total score. Then, the patients were grouped into qualitative criteria—higher score and lower score according to the total scores observed, independently of RX and CT, using the median base.

Scores 0 and 1 were grouped into lower severity scores, with values with a median below 2 for RX analyzes and below 12.5 for CT.

Scores 2 and 3 were grouped into a severity score, with values above 2 for RX and above 12.5 for CT.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Stat View program (ABACUS Concepts – USA). For the comparison of non-normal distribution variables between the major and minor groups, the Mann Whitney test was used. Differences were considered statistically significant when the probability of their chance-related occurrence was less than 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

The mean age of the patients was 48.63 years (22–86), of which 9 were men and 12 were women, 11 of which were smokers and 3 were drug users. No patient had clinical symptoms of active tuberculosis in the imaging studies.

The predominant alterations in CT were bronchiectasis, reticulations, calcified subcentric nodules and calcified (90.48%). Five patients had bilateral cysts (23.81%), 3 had thin-walled cavities (14.29%) and 2 had thick-walled cavities (9.52%). Seven patients had segmental atelectasis, corresponding to 33.33% (Table 1). Only 1 patient had bronchial mucocele and centrilobular nodules bilaterally, and only 1 presented pleural effusion with pleural thickening. Ground-glass opacities was observed bilaterally in 1 case, due to probable correlation with smoking. There was no identification of cases with bronchial atresia or consolidations (Table 1).

Table 1: Distribution of the lesions observed in the radiological examinations by CT, according to their incidence.

COMPUTED TOMOGRAPHY	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
THIN-WALLS CAVITIES	2 (9%)	0	1 (4%)
THICKNESS WALLS CAVITIES	1 (4%)	0	1 (4%)
BRONCHIECTASIAS	2 (9%)	3 (14%)	8 (38%)
RETICULATIONS	8 (38%)	2 (9%)	9 (42%)
LINEAR ATELECTASIS	8 (38%)	2 (9%)	9 (42%)
ATELECTASIS	6 (28%)	0	1 (4%)
SMALL NODULES WELL DEFINED WITH OR WITHOUT CALCIFICATIONS	1 (4%)	4 (19%)	5 (23%)
CALCIFIED SUBCENTIMETRIC NODULES	6 (28%)	0	13 (61%)
CYST	0	0	5 (23%)
OPACITY	0	0	0
GROUND-GLASS OPACIFICATION	0	0	2 (9%)
BRONCHIAL MUCOCELE	19 (90%)	0	1 (4%)
BRONCHIAL ATRESIA	0	0	0
CENTROLOBULAR NODULES	0	0	1 (4%)

As with RX, there was a predominant involvement of the upper lobes of the lungs, more evident to D (90.48%), with a lower frequency on the left (57.14%). There was a 38.10% involvement of the right lower lobe and 47.62% of the lower left lobe (Table 2).

Table 2: Distribution of the lesions observed in X-ray examinations according to their incidence.

X-RAY	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
THIN-WALLS CAVITIES	0	0	0
THICKNESS-WALLS CAVITIES	1 (4%)	0	1 (4%)
BRONCHIECTASIAS	1 (4%)	0	1 (4%)
RETICULATIONS	9 (42%)	1 (4%)	2 (9%)
ATELECTASIS	1 (4%)	0	0
CALCIFIED MEDIASTINAL LYMPH NODES	0	0	1 (4%)
THICKNESS AND PLEURAL CALCIFICATION	0	0	0
SMALL QUALIFYING NODULES WITH OR WITHOUT CALCIFICATIONS	1 (4%)	0	2 (9%)
CALCIFIED SUBCENTIMETRIC NODULES	2 (9%)	0	5 (23%)
CYST	0	0	0
OPACITY	0	0	1 (4%)

The predominant alterations in RX were the joints (57.15%) and the subcentimetric calcified or non-calcified nodules (33.3%), with predominant involvement of the right upper lobe (66.7%), followed by the left part (33.7% %). At the RX, there was no detection of thin-walled cavities, thickening and pleural calcification, as well as cysts. Thick-walled cavities and bronchiectasis were found in 2 cases (9.6%), and small, well-defined nodules, with or without calcifications, were found in 3 cases (14.3%).

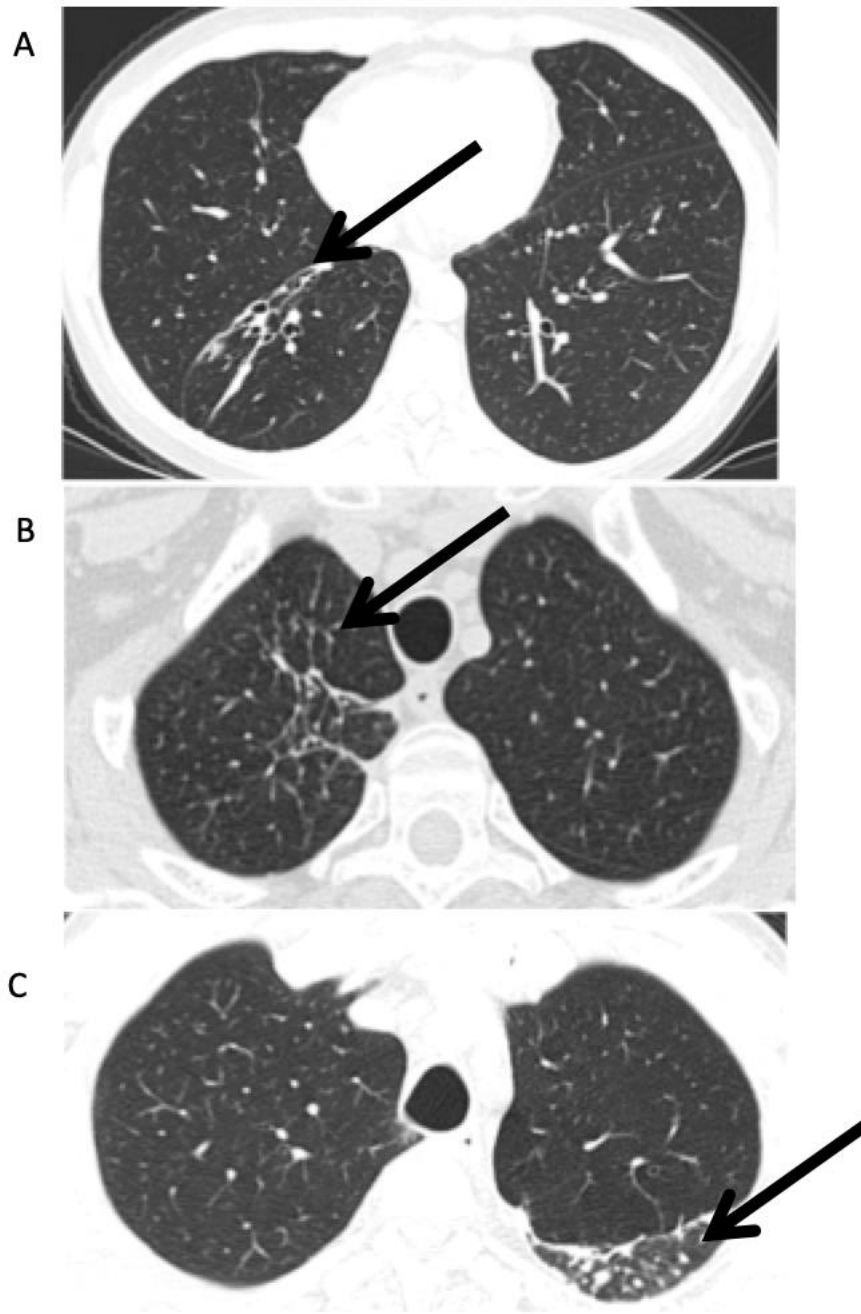


Figure 1: Representation of tomographic changes in axial sections in the pulmonary window: (A) bronchiectasis in the lower lobe of the right lung (arrow) (b) reticulations in the right upper lobe (arrow) and (c) small nodules (arrow).

When analyzing the IL-17 levels obtained from PBMC culture supernatants under conditions of *M. tuberculosis* antigens and compared with the scores of greater or lesser severity on CT, it was observed that IL-17 levels were significantly higher in the groups that presented higher severity scores (Figure 2A, Mann Whitney, $p = 0.03$). Lymphotoxin levels did not present significant differences when compared between the types of scores (Figure 2A, Mann Whitney, $p = 0.34$).

No significant difference was observed in the RX exams, when comparing IL-17 levels with the types of scores (Figure 2B, Mann Whitney, $p = 0.90$). Likewise, lymphotoxin levels, compared to RX scores, did not show significant differences (Figure 2B, Mann Whitney, $p = 0.66$).

When analyzing IFN- γ levels in the same PBMC culture supernatants and compared with the higher or lower CT scoring scores, IFN- γ levels did not demonstrate significant differences (Figure 2C, Mann Whitney, $p = 0.56$). Similarly, IL-12 levels did not present significant differences when compared between the scores analyzed on CT (Figure 2C; Mann Whitney, $p = 0.16$). There was no significant difference in the RX exams, when comparing the levels of IFN- γ between the scores (Figure 2D, Mann Whitney, $p = 0.10$). Likewise, there was no significant difference in IL-12 levels (Figure 2D; Mann Whitney; $p = 0.10$).

When analyzing TNF- α levels in these culture supernatants, there were no significant differences among the CT or higher severity scores (Figure 2E; Mann Whitney, $p = 0.62$). Similarly, IL-10 levels did not show significant differences when compared between the scores analyzed on CT (Figure 2E, Mann Whitney, $p = 0.93$). In the RX exams, when comparing TNF- α levels between the scores, there was no significant difference (Figure 2F, Mann Whitney, $p = 0.56$). Likewise, there was no significant difference in IL-10 levels (Figure 2F, Mann Whitney, $p = 0.23$).

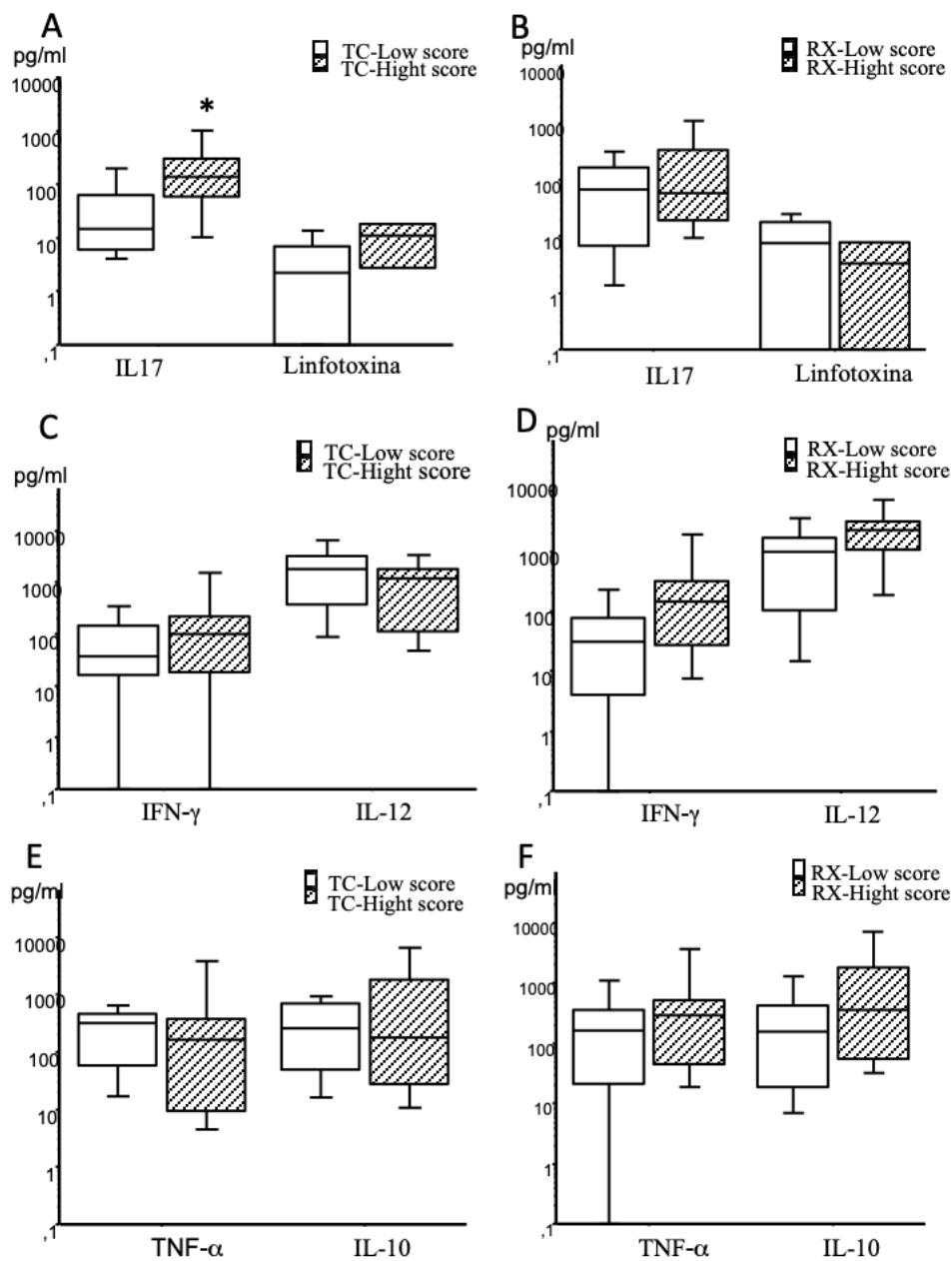


Figure 2: Cytokine levels obtained from PBMC culture supernatants under stimulation conditions with *M. tuberculosis* antigens and compared with higher or lower severity scores on CT and RX exams. The horizontal line represents the median; the bar, the 25% to 75% percentile; and the vertical line, the percentile of 10 to 90%. $p < 0.05$. (A) Cytokine levels IL-17 and linfotoxina (pg/ml) in TC (B) Cytokine levels IL-17 and linfotoxina (pg/ml) in RX (C) Cytokine levels IL-12 and IFN- cytokine levels IL-10 and TNF- α (pg/ml) in TC and (F) Cytokine levels IL-12 and IFN- γ (pg / ml) in RX IL-10 and TNF- α (pg / ml) in RX.

Elevated levels of IL-17 were observed in patients with scores of greater severity of the pulmonary lesions as a whole. Thus, IL-17 levels were analyzed on each of the scores individually. Our results imply that high scores on subcentimetric nodules are significantly associated with elevated levels of IL-17 (Figure 3) (Kruskall Wallis; $p = 0.011$). These results do not exclude the contribution of the atelectatic

and cross-linkage scores, which together also seem to contribute to the association observed in the set of scores.

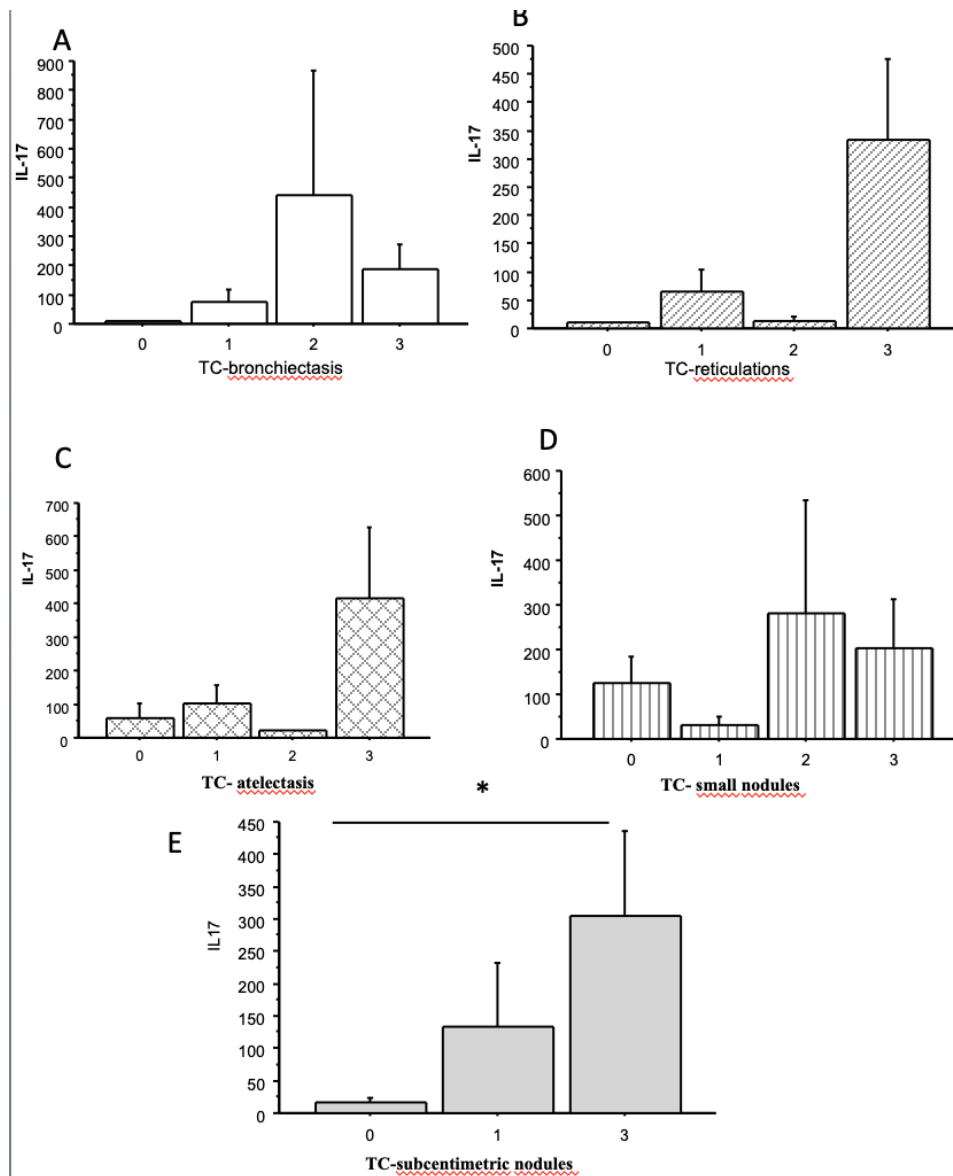


Figure 3: Comparison of predominant lung lesion scores with IL-17 levels (Kruskal Wallis; $p = 0.011$). (a) TC-bronchiectasis (b) TC-reticulations (c) TC-atelectasis (d) TC-small nodules and (e) TC-subcentimetric nodules.

DISCUSSION

During active tuberculosis, the production of IFN- γ , LT- α , TNF- α and IL-17 was detected. These are potent inflammatory cytokines, capable of inducing the expression of chemokines, promoting cell recruitment and still collaborating in the organization of the granuloma, throughout the infection. On the other hand, IL-10 limits and controls the inflammatory process (27, 28). IFN- γ , together with TNF- α , stimulates macrophages to produce nitric oxide (NO), synthesized from the action of Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2), which potentiates the microbicidal mechanisms of macrophages (17,18,29). IL-12 induces a modulation for the response of Th1 cells producing IFN- γ and TNF- α (30,31), and it has been shown that neutrophil granule proteins can promote IL-12 secretion by macrophages (37). In our study, levels of IFN- γ , TNF- α and IL-12 were detected; however, when compared with the pulmonary alterations evaluated in the X-ray and CT scans, no significant differences were observed. Thus, our results suggest that, in the active phase of the lesion, IFN- γ and TNF- α may contribute to the containment of the infection but are not directly associated with the changes observed in the radiological exams during the clinical healing phase.

On the other hand, IL-17 levels in the present study were significantly higher in patients who presented higher severity scores when analyzed on CT. IL-17, in the active phase of the disease, has been described both as having protective and deleterious effects on the host (21) (12). One of the important properties of IL-17 is to activate and recruit neutrophils to the site of aggression (12). The exact role of neutrophils in the pathogenesis of TB is poorly understood. Evidence points out that in patients with active TB, *M. tuberculosis* appears to infect neutrophils predominantly, and these intracellular bacteria begin to replicate rapidly within these cells (32). In experimental models, it has been shown that neutrophils may play a key role in the early and accurate formation of granuloma without influencing restriction of mycobacterial growth (33).

Furthermore, exposure of neutrophils to IL-17 or IL-23 can alter the homeostasis of these cells, resulting in severe tissue inflammatory lesion associated with infection (34). Thus, findings from the literature and the results found in our study suggest that IL-17, produced at high levels during the active phase of the

infection, promotes more extensive tissue damage and leads to the development of cicatricial lesions. We also emphasize the most frequent lesions observed at CT, which were bronchiectasis, reticulations, atelectasis bands and subcentimetric nodules/small calcified or non- calcified nodules. These lesions are common complications of tuberculosis and are typically secondary to pulmonary destruction and fibrosis (9) (35) (36).

Thus, during active infection, a balance between Th1 and Th17 responses needs to be achieved, to control bacterial growth and limit the mechanisms of immune response, because a change in a response associated with excessive IL-17 production may support the intense recruitment of neutrophils, leading to tissue damage (12) (22).

Several pulmonary alterations can be observed after the clinical cure of tuberculosis. They are the result of the presence of bacteria and the immune system's reaction to infection. This inflammatory reaction aims at the elimination or at least containment of the microorganism. The nature and intensity of the immune response may influence the control of infection and the extent of tissue damage associated in addition to that. Image exams, RX and CT, are a important resources for evaluating these lesions. In the present study, X-ray and CT scans were used to evaluate the pulmonary involvement and compare the lesions found with the cytokines produced by peripheral blood lymphocytes from the patients when they were in active disease phase.

Tuberculosis continues to be one of the greatest public health challenges, not only in the means and instruments of infection control but also in the prevention of the resulting cicatricial lesions, which can affect the patient's respiratory capacity and compromise his life condition in aging.

CONCLUSION

RX and chest CT are important in the detection of sequelae in the clinical management of chronic pulmonary tuberculosis. The levels of lymphotoxins, TNF- α , IFN- γ , IL-12 and IL-10 are not associated with higher severity scores observed on X-ray and CT scans. However, elevated levels of IL-17 in active tuberculosis infection are associated with more severe pulmonary lesions after clinical cure when analyzed on CT scans.

REFERENCES

1. WHO - Global Tuberculosis Report 2016. World Health Organization; 2016.
2. WHO - Global Tuberculosis Report 2016. World Health Organization; 2018.
3. SINAN - Sistema de Informação de Agravos e Notificações - SINAN NET - 2014 2014
4. Lazarevic V, Flynn J. CD8+ T cells in tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(8):1116-21.
5. Hartman-Adams H, Clark K, Juckett G. Update on latent tuberculosis infection. *Am Fam Physician*. 2014;89(11):889-96.
6. Nachiappan AC, Rahbar K, Shi X, Guy ES, Mortani Barbosa EJ, Jr., Shroff GS, et al. Pulmonary Tuberculosis: Role of Radiology in Diagnosis and Management. *Radiographics*. 2017;37(1):52-72.
7. Jeong YJ, Lee KS. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191(3):834-44.
8. Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. Tuberculosis: a radiologic review. *Radiographics*. 2007;27(5):1255-73.
9. Harisinghani MG, McCloud TC, Shepard JA, Ko JP, Shroff MM, Mueller PR. Tuberculosis from head to toe. *Radiographics*. 2000;20(2):449-70; quiz 528-9, 32.
10. Romano M, D'Souza S, Adnet PY, Laali R, Jurion F, Palfliet K, et al. Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. *Vaccine*. 2006;24(16):3353-64.
11. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology*. 2007;8(4):369-77.
12. Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, Pena D, Rovetta AI, Tateosian NL, et al. IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91(6):991-1002.

13. Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):294-309.
14. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology*. 2001;19:93-129.
15. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *Journal of immunology*. 1999;162(9):5407-16.
16. Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *The Journal of experimental medicine*. 2001;193(3):271-80.
17. Flesch IE, Kaufmann SH. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infection and immunity*. 1991;59(9):3213-8.
18. Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Toossi Z. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 1997;78(5-6):247-55.
19. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine*. 1993;178(6):2243-7.
20. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and immunity*. 2001;69(7):4195-201.
21. Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, et al. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *Journal of immunology*. 2006;177(3):1416-20.
22. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(6):455-62.
23. Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(11):2251-62.
24. da Silva MV, Figueiredo AA, Machado JR, Castellano LC, Alexandre PB, Oliveira RF, et al. T Cell Activation and Proinflammatory Cytokine Production in

Clinically Cured Tuberculosis Are Time-Dependent and Accompanied by Upregulation of IL-10. *PloS one*. 2013;8(6):e65492.

25. Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M, Pai M. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(3):188-200.

26. Silva D, Silva MVD, Barros CCO, Alexandre PBD, Timoteo RP, Catarino JS, et al. TNF-alpha blockade impairs in vitro tuberculous granuloma formation and down modulate Th1, Th17 and Treg cytokines. *PloS one*. 2018;13(3):e0194430.

27. Flynn JL, Chan J. What's good for the host is good for the bug. *Trends in microbiology*. 2005;13(3):98-102.

28. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *The Journal of Immunology*. 2010;ji_0903332.

29. Denis M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cellular immunology*. 1991;132(1):150-7.

30. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology*. 1997;159(2):635-43.

31. Hickman SP, Chan J, Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *Journal of immunology*. 2002;168(9):4636-42.

32. Eum SY, Kong JH, Hong MS, Lee YJ, Kim JH, Hwang SH, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*. 2010;137(1):122-8.

33. Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hauser AE, Lu B, Gerard NP, et al. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *European journal of immunology*. 2003;33(10):2676-86.

34. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *European journal of immunology*. 2007;37(10):2695-706.

35. Bhalla AS, Goyal A, Guleria R, Gupta AK. Chest tuberculosis: Radiological review and imaging recommendations. *Indian J Radiol Imaging*. 2015;25(3):213-25.

36. Bombarda S, Figueiredo CM, Seiscento M, Terra Filho M. Pulmonary tuberculosis: tomographic evaluation in the active and post-treatment phases. Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina. 2003;121(5):198-202.
37. Silva MT. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. Journal of leukocyte biology. 2010;87(5):805-13.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da Sinalização do TNF-alfa e da IL-10 na Formação e Regulação do Granuloma in vitro na Tuberculose Humana

Pesquisador: Virmondos Rodrigues Junior

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 65821716.5.0000.5154

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.112.036

Apresentação do Projeto:

Segundo o pesquisador: "Atualmente estima-se que um terço da população mundial esteja infectado com o Mycobacterium tuberculosis. Segundo a OMS em 2014 cerca de 8,6 milhões de novos casos de tuberculose foram notificados, com 1,6 milhões de mortes devido à doença (WHO). A tuberculose tem sido notificada em quase todos os países do mundo, com aproximadamente 80% dos casos de tuberculose concentrados em 22 países, onde o Brasil se encontra em 16º entre estas 22 nações. Estima-se que aproximadamente 50 milhões de pessoas estejam infectadas com o M.tuberculosis, e cerca de 70 mil novos casos e sete mil mortes por ano (WHO 2013, Dara, Acosta et al. 2014, Sanches, Carvalho et al. 2015). O estado de Minas Gerais apresentou uma média de 6.085 casos/ano nos últimos seis anos, com uma incidência de 23 casos/100.000 habitantes, a quarta maior entre os estados brasileiros. A cidade de Uberaba reportou 92 casos confirmados de tuberculose em 2015 (Spindola De Miranda, Campos De Oliveira et al. 2012, SINAN 2014).

Cerca de 90-95% dos casos a infecção por M. tuberculosis ocorre de forma assintomática e não transmissível, sendo denominado de tuberculose latente. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada pelo M. tuberculosis, mas dos infectados, somente 5-10% desenvolvem a doença ativa em algum momento de suas vidas (WHO 2013, Hartman-Adams, Clark et al. 2014).

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Citocinas Th1, especialmente IFN- e TNF- se mostraram essenciais na restrição da infecção com *M. tuberculosis*. O IFN- atua conjuntamente com o TNF- na ativação de macrófagos, potencializando seus mecanismos microbicidas (Denis 1991, Flesch and Kaufmann 1991, Rich, Torres et al. 1997). O TNF- atua em sinergia com IFN- na estimulação da produção de NO por macrófagos, e influencia a expressão de quimiocinas, que direcionam as células e, provavelmente, também auxiliam na manutenção destas no sítio infeccioso, além de ser uma citocina chave na formação e manutenção dos granulomas (Flynn and Chan 2005). Além disso, o TNF- induz a apoptose em células infectadas, isso faz com que as micobactérias, sejam privadas de seu nicho (Fratazzi, Arbeit et al. 1999).

Especificamente, a participação da IL-10 na dinâmica do funcionamento da resposta imune, no direcionamento e manutenção de subtipos de linfócitos T auxiliares e na repercussão de seus efeitos no desenvolvimento e no controle à longo prazo do repertório de linfócitos e, em última instância, na manutenção da resposta imune a microrganismos tem sido alvo de intensa investigação,

ainda se mostrando controversa de modo geral e também na tuberculose. Camundongos IL-10^{-/-} infectados com *M. tuberculosis* não mostram produção aumentada de IFN- (MURRAY et al., 1997), embora, a longo prazo, possam apresentar descontrole sobre a resposta inflamatória, com progressão da doença (HIGGINS et al., 2009). Existe um crescente corpo de evidências sugerindo que a relação entre citocinas Th1 e IL-10 não é tão antagônica quanto se acreditava inicialmente e, em doenças infecciosas parecem atuar de forma complementar (JANKOVIC et al., 2007). Estudos demonstram que para algumas doenças infecciosas há um aumento de IL-10 que potencialmente atua na diminuição dos efeitos deletérios da reação inflamatória derivada de citocinas Th1, sem prejudicar o clearance de agentes infecciosos (JANKOVIC et al., 2007). Infecções onde o controle do agente infeccioso se faz por forte resposta Th1, como *Listeria monocytogenes*, *Trypanosoma cruzi* e vírus Influenza, a presença concomitante de IL-10 pode atuar na prevenção de danos teciduais associados à resposta Th1 (HUNTER et al., 1997; DECKERT et al., 2001; SUN et al., 2009). Outras citocinas como: IL-17, IL-12, LT- e IL-4 participam diretamente no combate ao *M. tuberculosis*.

A formação do granuloma é essencial para o controle e manutenção de micobactérias, mas apesar desta ativação alguns bacilos sobrevivem contidos pela reação granulomatosa, levando o a tuberculose no estado denominado de latência (Saunders and Britton 2007). Se por um lado o granuloma restringe a infecção tuberculosa, por outro desenvolve uma infecção totalmente assintomática crônica, que prepara o terreno pra uma possível reativação (Parrish, Dick et al. 1998,

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Saunders and Britton , Schreiber and Sandor 2010). Fatores que perturbam esse delicado equilíbrio entre micobactérias e a manutenção do granuloma, inevitavelmente, aumentam o risco de reativação da doença. O uso de imunobiológicos revolucionou o desfecho clínico de muitas doenças reumáticas, especialmente na artrite reumatoide (AR), artrite idiopática juvenil (AIJ), bem como nas Doenças Inflamatórias Intestinais (Yasui 2014). Imunobiológicos bloqueadores de TNF como Infliximabe, Adalimumabe e Etanercept promovem uma melhora significativa no quadro clínico e na qualidade de vida destes pacientes, entretanto é um fator predisponente na reativação da tuberculose latente (Keane, Gershon et al. 2001). Portanto é extremamente necessário que os médicos se atentem para o risco de tuberculose e infecções fúngicas granulomatosas, antes de prescreverem inibidores de TNF e outros imunobiológicos e, além disso, monitorar os possíveis efeitos colaterais como um componente crucial no tratamento das doenças inflamatórias crônicas.

PERGUNTAS DA PESQUISA

- Compreender os fenômenos imunes associados ou decorrentes do bloqueio das vias de sinalização do TNF e da IL-10.
- Compreender o funcionamento de células mononucleares do sangue periférico em culturas in vitro sem interferência, e com bloqueio da IL-10 e do TNF-.
- Compreender a expressão intracelular de citocinas e fatores de transcrição nas células componentes dos granulomas"

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador: "Analisar a formação e regulação do granuloma in vitro na tuberculose, através do bloqueio das vias de sinalização de IL-10 e TNF-.

Analisar o índice de granuloma in vitro em culturas de células mononucleares do sangue periférico sem interferência, e com bloqueio da IL-10 e do TNF-;

Analisar a expressão intracelular de citocinas e fatores de transcrição nas células componentes dos granulomas de 5 e 10 dias através de citometria de fluxo e microscopia de Fluorescência;

Determinar a organização espacial e interação célula-célula através de microscopia de fluorescência;

Avaliar a produção de citocinas, quimiocinas e a morte celular por ativação nas células componentes dos granulomas através de Cytometric Bead Array;

Analisar a expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição das células

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.112.036

componentes dos granulomas in vitro;

Avaliar a expressão de moléculas de adesão nas células componentes do granuloma por citometria de fluxo e qRT-PCR."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador: "O desconforto previsto para os pacientes se refere à coleta de sangue, que será reduzida ao mínimo possível ao ser feita por profissional devidamente treinado e sempre com o consentimento do indivíduo. As entrevistas serão realizadas somente com esclarecimento prévio sobre a pesquisa e assinatura do termo de consentimento para reduzir qualquer dano emocional e moral. O pequeno risco de perda de confidencialidade dos resultados será minimizado com a identificação dos pacientes por números e a restrição do uso dos dados apenas pelos pesquisadores responsáveis."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, com análises experimentais que trarão benefício no entendimento da fisiopatogenia da tuberculose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e norma operacional 001/2013, o colegiado do CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto, em reunião do dia 02/06/2017.

Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFTM dá-se em decorrência do atendimento à Resolução CNS 466/12 e norma operacional 001/2013, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Conforme prevê a legislação, são responsabilidades, indelegáveis e indeclináveis, do pesquisador responsável, dentre outras: comunicar o início da pesquisa ao CEP; elaborar e apresentar os relatórios parciais (semestralmente) e final. Para isso deverá ser utilizada a opção 'notificação' disponível na Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.112.036

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_833560.pdf	29/05/2017 11:46:14		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PPD_2017.doc	29/05/2017 11:43:23	DJALMA ALEXANDRE ALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_03_05_2017.doc	03/05/2017 10:29:10	Marly Aparecida Spadotto Balarin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	formulario_CEP_03_05_2017.docx	03/05/2017 10:19:26	Marly Aparecida Spadotto Balarin	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_anuencia.pdf	02/05/2017 17:42:04	DJALMA ALEXANDRE ALVES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2017.doc	08/03/2017 16:43:43	DJALMA ALEXANDRE ALVES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	formulario_CEP.doc	08/03/2017 16:43:09	DJALMA ALEXANDRE ALVES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_para_pesquisa_envolvendo_seres_humanos.pdf	07/12/2016 11:41:03	DJALMA ALEXANDRE ALVES DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 09 de Junho de 2017

Assinado por:
Marly Aparecida Spadotto Balarin
(Coordenador)

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Journal Menu

- About this Journal
- Abstracting and Indexing
- Aims and Scope
- Article Processing Charges
- Bibliographic Information
- Editorial Board
- Editorial Workflow
- Publication Ethics
- Reviewer Resources
- Subscription Information
- Table of Contents

Special Issues Menu

- Annual Issues
- Open Special Issues
- Published Special Issues
- Special Issue Resources



Subscribe to
Table of Contents Alerts

Tissue-Specific Immunity in Homeostasis and Diseases

Call for Papers

Unlike immune responses in primary and secondary lymphoid organs, such as thymus, bone marrow, spleen, and lymph nodes, tissue-specific immunity, including tissues of skin, liver, lung, adipose tissue, kidney, joint, and gastrointestinal tract, as well as tumors, is poorly investigated. Diversified innate and adaptive immune cells indeed reside in specific tissues, regulating homeostasis and function. Recent studies demonstrate genetic and functional distinctions between tissue-resident immune cells and their counterparts from lymphoid organs. Tissue-specialized immune cells interplay with their local environment, by direct cell-cell interaction or indirectly through cytokines and interleukins. Proper tissue-resident immunity is critical for tissue environment homeostasis, regeneration, and repair, as well as immune surveillance to pathogens. Therefore, better understanding of tissue-specific immunity would extend our knowledge and improve therapeutic strategies in wound healing, autoimmune diseases, inflammatory diseases, and infectious diseases.

This special issue aims to present recent progress in tissue-specific immunity, including both steady-state and pathological scenarios and their related clinical applications. We encourage authors to submit their original research articles, reviews, and minireviews.

Potential topics include but are not limited to the following:

- ▶ Immune responses in nonlymphoid tissues, including liver, skin, lung, kidney, adipose tissue, joint, gastrointestinal tract, and mucosal barrier
- ▶ Tissue-specific immune cells in the maintenance of tissue homeostasis
- ▶ Tissue-specific immune cells in infectious and noninfectious diseases
- ▶ Tissue-specific immune cells in autoimmune diseases
- ▶ Tumor infiltrated immune cells
- ▶ Immune control in tissue regeneration and repair after damage
- ▶ Treatments targeting tissue-specific immunity

Authors can submit their manuscripts through the Manuscript Tracking System at <https://mts.hindawi.com/submit/journals/jir/nitih/>.

Submission Deadline Friday, 22 March 2019
Publication Date August 2019

Papers are published upon acceptance, regardless of the Special Issue publication date.

Lead Guest Editor

- ▶ Ning Wu, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

Guest Editors

- ▶ Erwei Sun, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, China
- ▶ Dongfang Liu, Houston Methodist Research Institute, Houston, USA
- ▶ Di Yu, Australian National University, Canberra, Australia



About Hindawi
Meet the Team
Contact Us
Blog
Jobs

Publish with Us
Submit Manuscript
Browse Journals
For Authors

Work with Us
Institutions
Publishers
Editors

Legal
Terms of Service
Privacy Policy
Copyright