



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**TUBERCULOSE NO IDOSO: REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E
NÍVEIS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS**

CINTIA MICHELE GONDIM DE BRITO

Recife, 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**TUBERCULOSE NO IDOSO: REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E
NÍVEIS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS**

CINTIA MICHELE GONDIM DE BRITO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria de Fátima Pessoa
Militão Albuquerque
Prof^a Adjunta do Depto de Medicina Clínica,
CCS/UFPE
Co-orientadora: Maria Cynthia Braga
Prof^a do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/
Fiocruz

Recife, 2010



Brito, Cintia Michele Gondim de

Tuberculose no idoso: reatividade ao teste tuberculínico e níveis de células T regulatórias / Cintia Michele Gondim de Brito Lima. – Recife : O Autor, 2010.
xxii + 96 folhas; il., fig., tab. e gráf.; 31 cm.

Orientador: Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências da Saúde, 2010.

Inclui bibliografia e anexos e apêndices.

1. Tuberculose. 2. Idosos. 3. Teste tuberculínico. 4. Células T regulatórias. 5. Imunidade. I. Albuquerque, Maria de Fátima Pessoa Militão de. I. Título.

UFPE

616.995

CDD (20.ed.)

CCS2011-06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RELATÓRIO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CINTIA MICHELE GONDIM DE BRITO LIMA, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, TURMA INICIADA EM 2008 (DOIS MIL E OITO)

Às nove horas, do dia treze de setembro de dois mil e dez, no Prédio das Pós-Graduações do CCS, tiveram início, pelo Coordenador do Curso, Prof^o. Dr. José Ângelo Rizzo, o trabalho de Defesa de Dissertação, da mestrand **Cintia Michele Gondim de Brito Lima**, para obtenção do **Grau de Mestre em Ciências da Saúde** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. A Comissão Julgadora eleita pelo Colegiado do Curso e homologada pelas Câmaras de Pesquisa e Pós-Graduação foi formada pelos professores: **Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto**, do Departamento de Medicina Clínica da UFPE, **Dr.^a Cristiane Moutinho Lagos de Melo**, Pesquisador Visitante do Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, **Dr. Antonio Roberto Leite Campelo**, Professor aposentado do Departamento de Medicina Clínica da UFPE. A Dissertação apresentada versou sobre: "**Tuberculose no Idoso: Reatividade ao Teste Tuberculínico e Níveis de Células Regulatórias**" tendo como orientadora a Prof^a Dr.^a Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque, do Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Após a explanação de 30 minutos feita pela candidata, justificando a escolha do assunto, objetivos da Dissertação, metodologia empregada e resultados obtidos, ilustrados com diapositivos, foram realizadas as arguições pela Banca Examinadora, todos no tempo regulamentar e respondido pelo candidato. Ao término das arguições, a Banca avaliou em secreto e proferiu o seguinte resultado: "APROVADA". Nada mais havendo a registrar, foram encerrados os trabalhos, do que, para constar, foi elaborado o presente relatório que vai assinado pelo Senhor Presidente e demais membros da Comissão Julgadora. Recife, 13 de setembro de 2010.

Edmundo Lopes

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (Presidente)

Cristiane

Prof.^a Dr.^a Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Antonio Roberto Leite Campelo

Prof. Dr. Antonio Roberto Leite Campelo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilmar Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR**

Prof. José Thadeu Pinheiro

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR-SUPERINTENDENTE**

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

Prof.^a Jocelene Madruga

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
COORDENADOR**

Prof. José Ângelo Rizzo

VICE-COORDENADOR

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

CORPO DOCENTE

Prof.^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof.^a. Ângela Luzia Pinto Duarte

Prof.^a. Antônio Roberto Leite Campelo

Prof. Brivaldo Markam Filho

Prof. Edgar Guimarães Victor

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof.^a. Heloísa Ramos Lacerda Melo

Prof. José Ângelo Rizzo

Prof.^a. Luciane Soares de Lima

Prof. Lúcio Villar Rabelo Filho

Prof. Lurildo Cleano Ribeiro Saraiva

Prof.^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

DEDICATÓRIA

A Deus, familiares, amigos e aos pacientes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por iluminar a minha vida em todos os momentos, dando forças para superar as provações da vida;

Aos meus filhos Arthur e Sophia que nos momentos difíceis me trouxeram paz;

Ao meu esposo Jairo Lima Filho, que sempre esteve ao meu lado, incentivando e acreditando nos meus objetivos;

Aos meus pais Carlos e Fátima por ter o privilégio de ser filha deles;

Aos meus irmãos Carlos Jr., Carla e sobrinhas Déborah e Geovanna por sempre torcerem por mim;

Aos meus avôs Antônio e Elbe pelos ensinamentos da vida;

Aos meus sogros, cunhados, cunhadas, tios, tias, minha madrinha Moema, prima-irmã Marja, cunhada-amiga Yerma e toda minha família por estarem sempre ao meu lado;

in memoriam da minha tia avó Stela, Tia Zezé e bisavó Adelina por estarem iluminando minha caminhada;

As Professoras Maria de Fátima Militão e Maria Cynthia Braga, pela orientação científica, amizade, confiança e a oportunidade dada para o desenvolvimento deste trabalho;

À técnica Katarine Dias Araújo, pela dedicação dispensada na parte experimental deste trabalho;

À colaboradora e grande amiga Priscila Castanha pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho;

Ao amigo Felipe Machado pela ajuda na parte estatística;

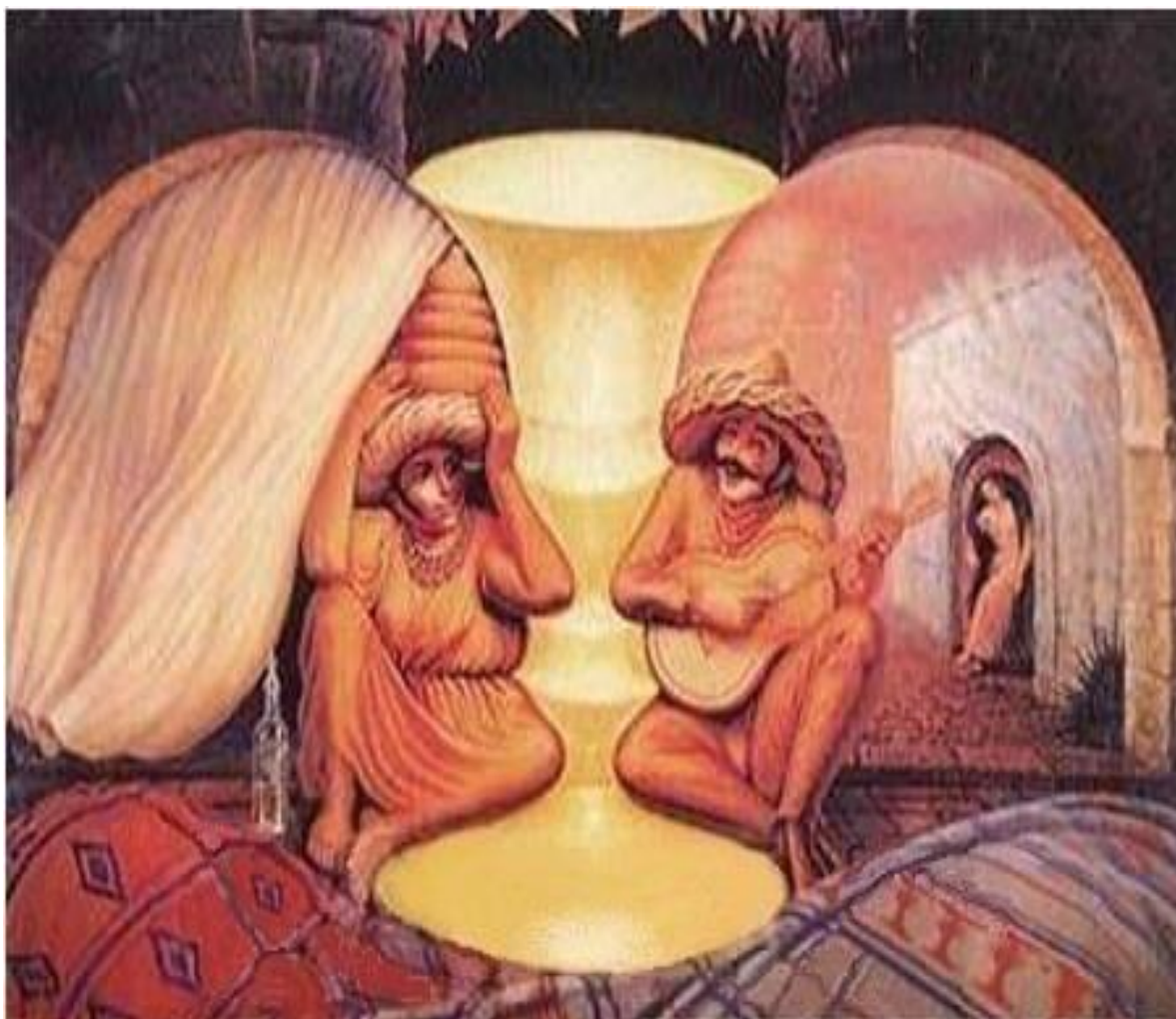
À Dra. Valéria Pereira, Dra. Zilda Cavalcanti, Dra. Ana Clara, Marina Souza, Renata Régis, Carol Araújo, Joanna D'arc e Mácia Saturnino pela amizade e auxílio concedidos sempre que solicitado;

A todos da pós-graduação do Centro de Ciências e Saúde principalmente Esmeralda, Andrea e Ana pela ajuda sempre que foi solicitada;

A todos da Secretaria Estadual e Municipal de Saúde, pelos momentos inesquecíveis de descontração, apoio, amizade, ajuda, estímulo, compreensão e convivência; em especial, Laíze (minha grande amiga), Elizabeth, Marcela, Inês Costa, Jacyra, Zuleide, Mirian, Goretti, Desi, Jaci, Solange, Valéria, Neuma, Deise, Laís, Raíssa, Luxa e Suzi;

Agradeço em especial, aos **PACIENTES** que aceitaram participar deste estudo, pois sem os mesmos este trabalho não seria concretizado;

A todos que de forma direta e indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.



Pense que não são os anos que nos envelhecem; mas sim, a idéia de ficarmos velhos...

CLARISSA HORST.

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	2
REFERÊNCIAS	11
ARTIGO 1	15
RESUMO	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. RESPOSTA IMUNE À TUBERCULOSE E ENVELHECIMENTO	22
1.2. ENVELHECIMENTO E REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO	26
REFERÊNCIAS	28
ARTIGO 2	36
RESUMO	38
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAS E MÉTODOS	43
2.1. Desenho e população de estudo	43
2.2. Coleta dos dados	43
2.3. Variáveis do Estudo	43
2.3.1. Variável dependente	43
2.3.2. Variáveis independentes	44
2.4. Considerações éticas	44
2.5. Análises Estatísticas	44
3. RESULTADOS	45
3.1. Características da população de estudo	45

3.2. Reatividade ao teste tuberculínico	46
3.3. Curva ROC	47
4. DISCUSSÃO	48
AGRADECIMENTOS	51
REFERÊNCIAS	52
ARTIGO 3	56
RESUMO	58
ABSTRACT	60
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAS E MÉTODOS	63
2.1. Desenho e população de estudo	63
2.2. Coleta dos dados	63
2.2.1. Purificação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	63
2.2.2. Descrição de Técnica de citometria de fluxo utilizando os marcadores celulares CD4+, CD25+FOXP3+	64
2.2.3. Obtenção de mRNA a partir de PBMC	64
2.2.4. Conversão de RNA em cDNA através de transcrição reversa	65
2.2.5. Avaliação da expressão de mRNA para FOXP3+	65
2.3. Variáveis do Estudo	66
2.4. Considerações éticas	66
2.5. Análises Estatísticas	66
3. RESULTADOS	66
3.1. Células T regulatórias (Ensaio imunológico)	67
3.2. Células T regulatórias (Biologia Molecular)	67
3.3. Células T regulatórias e teste tuberculínico	68
4. DISCUSSÃO	70
AGRADECIMENTOS	72

REFERÊNCIAS	72
CONCLUSÕES	76
ANEXOS	78
APÊNDICES	84

RESUMO

Considerada uma das principais doenças infecciosas em saúde pública, a tuberculose (TB) alcança níveis de alta endemicidade em países em desenvolvimento. Em 2008, o Brasil ocupava o 19º lugar entre os 22 países considerados de maior incidência. Neste mesmo ano o Estado de Pernambuco apresentava o mais alto coeficiente de incidência da região Nordeste e a Cidade do Recife (PE) a capital brasileira com mais casos novos de TB. Nos últimos 20 anos, a incidência de TB na população de idosos com idade igual ou acima de 60 anos, residentes no Recife, permaneceu sempre alta ao longo dos anos. Com o envelhecimento da população brasileira, a doença TB pode vir a constituir um grave problema, principalmente se considerarmos que as taxas de letalidade tendem a aumentar com a idade. Apesar disso, poucos estudos investigando o comportamento da tuberculose nessa população têm sido realizados no Brasil. A presente dissertação constou de três estudos abordando a tuberculose no idoso. No primeiro, realizou-se uma revisão bibliográfica acerca dos estudos publicados sobre fatores imunológicos relacionados ao desenvolvimento da TB no idoso, particularmente o papel das células T regulatórias (T regs), e sua relação com a reatividade ao teste tuberculínico (TT). A revisão bibliográfica foi realizada mediante uma busca *on-line* nas bases de dados *Medline-PubMed*, *Science-Direct*, *Lilacs*, *Bireme* e *Scielo*, com foco nas publicações dos últimos dez anos, nos idiomas português e inglês. Os resultados do primeiro artigo demonstram que poucos estudos têm avaliado o nível das células T regs na população idosa e a informação sobre essas células nesse grupo é limitada e controversa. Conclui-se com essa revisão que existe uma lacuna de informação no contexto da resposta ao TT e produção de células T regs em idosos com tuberculose. O segundo é um estudo tipo série de casos cujo objetivo foi descrever o padrão de reatividade ao TT e características dos indivíduos idosos com e sem TB doença e adultos com TB, assim como identificar o ponto de corte da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) que melhor discrimina idosos com e sem TB doença. Foram estudados 87 pacientes residentes da cidade do Recife, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. Os resultados do artigo 2 mostra que ao comparar a média em milímetros do valor do TT dos três grupos, essas são diferentes e a diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$). Além disso, ter idade entre 60 a 69 anos, ser do sexo masculino, está desnutrido, beber e fumar são características presentes no idoso com TB. A curva ROC identificou o ponto de corte de 5 mm como aquele que apresenta os valores de sensibilidade (0,61) e especificidade (0,78) mais elevados para discriminar os idosos com TB doença dos idosos sem TB doença. Com base nos resultados encontrados, sugerimos que o critério de positividade do TT nos indivíduos idosos seja revisto. O objetivo do terceiro estudo foi verificar a correlação entre os níveis de células T regs e a reatividade ao TT em idosos e adultos com TB e idosos sem TB. A expressão de FOXP3 por PCR em tempo real foi realizada em 61 pacientes, enquanto que quantificação das células Treg por citometria de fluxo em 25. Ao analisar a correlação do TT e células T regs observou-se que só houve correlação estatisticamente significativa no grupo de adultos com TB doença. Verificou-se ainda, uma correlação positiva entre o TT e os níveis de FOXP3 nos grupos de adultos e idosos com TB e uma correlação negativa no grupo de idosos sem TB. Os resultados encontrados no artigo 3 indicam uma diminuição dos níveis de células T regulatórias na circulação periférica de pacientes idosos com TB em atividade, sugerindo existir uma imunodepressão nesse grupo que pode ser responsável pela menor reatividade ao TT quando comparado aos adultos com tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose, idosos, imunidade, células T regulatórias, teste tuberculínico, Curva ROC.

ABSTRACT

Considered one of the major infectious diseases in public health, tuberculosis (TB) reaches high levels of endemicity in developing countries. In 2008, Brazil ranked 19th place among 22 countries considered to have higher incidence. That same year the State of Pernambuco had the highest incidence rate in the Northeast and the city of Recife was the Brazilian capital with more new cases of TB. Over the past 20 years, the incidence of TB in the elderly population aged over 60, living in Recife, has always been high over the years. With an aging population, TB disease can become a serious problem, especially since fatality rates tend to increase with age. Nevertheless, few studies investigating the behavior of tuberculosis in this population have been conducted in Brazil. This work consisted of three studies dealing with tuberculosis in the elderly. At first, there was a review of published studies on immunological factors related to development of TB in the elderly, particularly the role of regulatory T cells (T regs), and its relation to reactivity to the tuberculin test (TT). The literature review was conducted by an online search in Medline, PubMed, Science-Direct, Lilacs, and Scielo Bireme, focusing on publications of the last ten years, in Portuguese and English. The results of the first article showing that few studies have assessed the level of T cells regs in the elderly population and information on such cells in this group is limited and controversial. We concluded from this review that there is a lack of information in the context of the response to TT and T cell production regs in elderly patients with tuberculosis. The second is a case series study aimed to describe the pattern of reactivity to TT and characteristics of elderly individuals with and without TB disease and adults with TB, and identify the cutoff of ROC (*Receiver Operating Characteristic*) that best discriminates elderly with and without TB disease. We studied 87 patients living in Recife, from January 2008 to December 2009. The results of the second article shows that when comparing the mean value in millimeters of the TT of the three groups, these are different and the difference was statistically significant ($p = 0.001$). Moreover, aged between 60-69 years, being male, is malnourished, drinking and smoking are characteristically present in the elderly with TB. The ROC curve identified a cutoff of 5 mm as the one that shows the values of sensitivity (0.61) and specificity (0.78) higher for discriminating against older people with TB disease of the elderly without TB disease. Based on these results, we suggest that the criterion for positivity of TT in the elderly is reviewed. The third goal of the study was to investigate the correlation between levels of regulatory cells and reactivity to TT in the elderly and adults with tuberculosis and subjects without TB. The expression of FOXP3 by real time PCR was performed in 61 patients, whereas quantification of Treg cells by flow cytometry at 25. By analyzing the correlation between TT and T cells regs was observed that there was only statistically significant correlation in the group of adults with TB disease. There was also a positive correlation between TT and the levels of FOXP3 in groups of adults and older people with TB and a negative correlation in the elderly group without TB. The results found in Article 3 indicate a decrease in levels of regulatory T cells in peripheral blood of elderly patients with active TB, suggesting that there is a group that immunosuppression may be responsible for low reactivity to TT when compared with adults with tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, the elderly, immunity, regulatory T cells, tuberculin test, ROC curve.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS**ARTIGO 2**

Figura 1. Curva ROC exibindo o ponto de corte que maximiza a Sensibilidade e a Especificidade do TT para discriminar idosos com e sem tuberculose doença atendidos em serviços de saúde no Recife (PE) no período de janeiro/2008 a dezembro/2009

TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo (N=87) segundo aspectos biológicos e de hábitos de vida, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

Tabela 2. Padrão de reatividade ao TT dos 87 pacientes por diagnóstico clínico, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

ARTIGO 3

Tabela 1. Distribuição do percentual de FOXP3+ (GATE) com suas médias, na amostra de 25 pacientes, por grupo clínico, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

Tabela 2. Nível de expressão de FOXP3 identificado pela diferença dos valores do gene FOXP3 e gene constante (DeltaCt- Δ Ct) em 61 indivíduos, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

Tabela 3. Associação entre resposta ao TT em milímetros e percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em 25 pacientes atendidos em serviço de saúde no Recife (PE) no período de janeiro/2008 a dezembro/2009.

Tabela 4. Associação entre resposta ao TT em milímetros e percentual de FOXP3⁺ em 25 pacientes atendidos em serviço de saúde no Recife (PE) no período de janeiro/2008 a dezembro/2009.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ARTIGO 1

% - Porcentagem
 γ - Gama
 AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
 BCG - Bacilo de Calmette e Guérin
 CD4⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 4
 CD8⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 8
 CD25⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 25
 FOXP3⁺ - *forkhead Box p3*
 HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
 IFN- γ - interferon gama
 IL-2 - interleucina 2
 ITBL Infecção Tuberculosa Latente
 MHC - *Major Histocompatibility Complex*
M. tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis*
 PPD - protein purified derivative
 TB- Tuberculose
 Th1 - células CD4⁺ do tipo 1
 Tregs- Células T regulatórias
 TT- Teste Tuberculínico

ARTIGO 2

% - Porcentagem
 $\geq$ - Maior ou igual
 α - Alfa
 β - Beta
 γ - Gama
 μL – Microlitro
 ml- Mililitro
 AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
 BAAR - Bacilo Álcool-Ácido Resistente
 BCG - Bacilo de Calmette e Guérin
 CD4⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 4
 CD8⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 8
 CD25⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 25
 DP – Desvio Padrão
 FOXP3⁺ - *forkhead Box p3*
 HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
 IMC - Índice de Massa Corpórea
 ILTB - Infecção Latente Tuberculose
 IUATLD - International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
M. tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis*
 OMS- Organização Mundial de Saúde
 PPD - protein purified derivative

TB- Tuberculose
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tregs- Células T regulatórias
TT- Teste Tuberculínico

ARTIGO 3

%GATE - Corresponde ao percentual de FOXP3⁺ entre as células CD4⁺CD25⁺
CD4⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 4
CD25⁺ - Marcador de Membrana de Linfócitos T 25
CPqAM/FIOCRUZ - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DeltaCt(Δ Ct) - Diferença dos valores do gene FOXP3 e gene constante
FOXP3⁺ - *forkhead Box p3*
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
mm - Milímetros
M. tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis*
PCR - Reação de Polimerização em Cadeia
PCR quantitativa ou qPCR- Reação de Polimerização em Cadeia reversa
PPD - protein purified derivative
TB- Tuberculose
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tregs- Células T regulatórias
TT- Teste Tuberculínico



INTRODUÇÃO

APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

A tuberculose (TB) permanece como um problema de saúde pública de amplitude mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento. As estimativas indicam que o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) infecta 2,0 bilhões de pessoas em todo mundo, o que significa um terço da população mundial (RAVIGLIONE, 1995; OPS, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006). Em 2008 aproximadamente 80% dos casos novos ocorreram nos 22 países considerados como de maior incidência, o Brasil ocupava o 19º lugar desta classificação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Na Figura 1 pode-se observar a incidência estimada da TB nos diferentes territórios em 2008 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

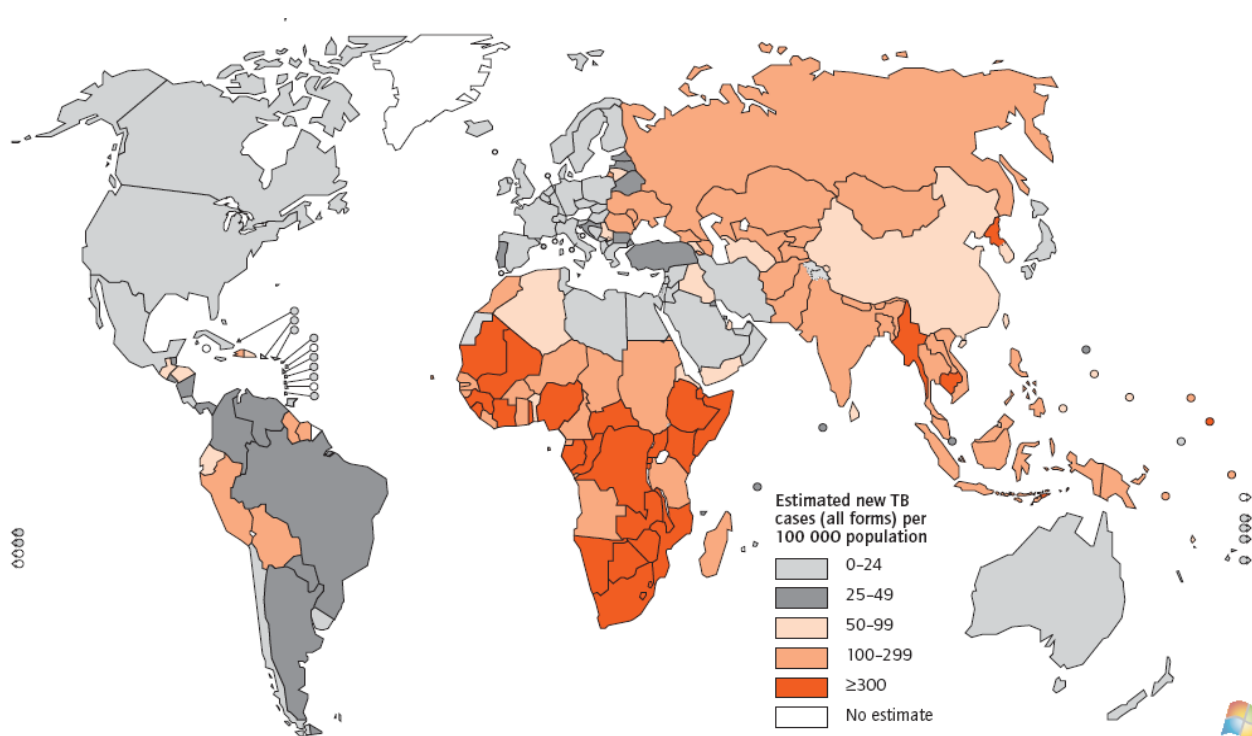


Figura 1. Incidência estimada de TB no ano de 2008.
Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2009



No Brasil, no ano de 2008, o coeficiente de incidência- calculado a partir dos casos notificados - foi de 37,4 por 100.000 habitantes (hab), revelando a magnitude do problema. Observados por região, verifica-se que os coeficientes de incidência mais altos são encontrados na região Norte e Sudeste 44,5% e 40,0% por 100.000 hab respectivamente, seguidos pela região Nordeste, onde a incidência é de 38,1 por 100.000 hab. Na Tabela 1 pode-se observar a incidência da TB no Brasil por Regiões e Estados da federação, em 2008.

Tabela 1. Incidência da tuberculose Brasil e Regiões no ano de 2008

UF Residência	Nº CASOS NOVOS	POPULAÇÃO 2008	INCIDÊNCIA (%)
BRASIL	70972	189612814	37,4
Rondonia	458	1493566	30,7
Acre	278	680073	40,9
Amazonas	2270	3341096	67,9
Roraima	128	412783	31
Pará	3201	7321493	43,7
Amapá	234	613164	38,2
Tocantins	175	1280509	13,7
NORTE	6744	15142684	44,5
Maranhão	2173	6305539	34,5
Piauí	910	3119697	29,2
Ceará	3650	8450527	43,2
Rio Grande do Norte	957	3106430	30,8
Paraíba	1069	3742606	28,6
Pernambuco	4159	8734194	47,6
Alagoas	1171	3127557	37,4
Sergipe	581	1999374	29,1
Bahia	5535	14502575	38,2
NORDESTE	20205	53088499	38,1
Minas Gerais	4511	19850072	22,7
Espírito Santo	1325	3453648	38,4



Rio de Janeiro	10863	15872362	68,4
São Paulo	15366	41011635	37,5
SUDESTE	32065	80187717	40
Paraná	2513	10590169	23,7
Santa Catarina	1646	6052587	27,2
Rio Grande de Sul	4617	10855214	42,5
SUL	8776	27497970	31,9
Mato Grosso do Sul	879	2336058	37,6
Mato Grosso	1081	2957732	36,5
Goiás	813	58445996	13,9
Distrito Federal	352	2557158	13,8
CENTRO-OESTE	3125	13695944	22,8
Ignorado/Em Branco	57		

Fonte: SINAN, em fevereiro 2010

Neste mesmo ano verificou-se o coeficiente de 47,6 por 100.000 habitantes no Estado de Pernambuco sendo o mais alto da região Nordeste (Tabela 1) e 132 casos por 100.000 habitantes na Cidade do Recife (PE), a capital brasileira com mais casos novos de Tuberculose no mesmo ano (SINAN/ DATASUS/ MS, 2010). Na população de idosos acima de 60 anos residentes no Recife no ano de 2008 a incidência foi de 123 por 100.000 habitantes (SINAN/ DATASUS/ MS, 2010). A Tabela 2 mostra uma série histórica da incidência de TB em idosos no Recife, nos últimos 20 anos, mostrando que a incidência da TB permaneceu sempre alta ao longo dos anos, principalmente se considerarmos a partir de 1993 (Figura 2). Fato que pode ser atribuído ao aumento no número de notificação e/ou coincide com o ano que a Organização Mundial de Saúde (OMS) decretou tuberculose como uma doença de “emergência mundial”, devido os altos índices de incidência na população em geral no ano de 1993 (Figura 2).



Tabela 2. Série histórica da incidência de tuberculose em idosos por 100.000 habitantes com ou mais 60 anos, por todas as formas, na Cidade do Recife (PE) no período de 1988-2008

ANO	INCIDÊNCIA
1988	117,06
1989	99,04
1990	88,84
1991	95,18
1992	65,98
1993	95,87
1994	118,37
1995	138,59
1996	140,72
1997	142,93
1998	142,73
1999	162,90
2000	125,06
2001	109,73
2002	122,06
2003	144,38
2004	141,74
2005	131,33
2006	116,75
2007	101,08
2008	122,76

FONTE: DIEVS/PCR, 2010

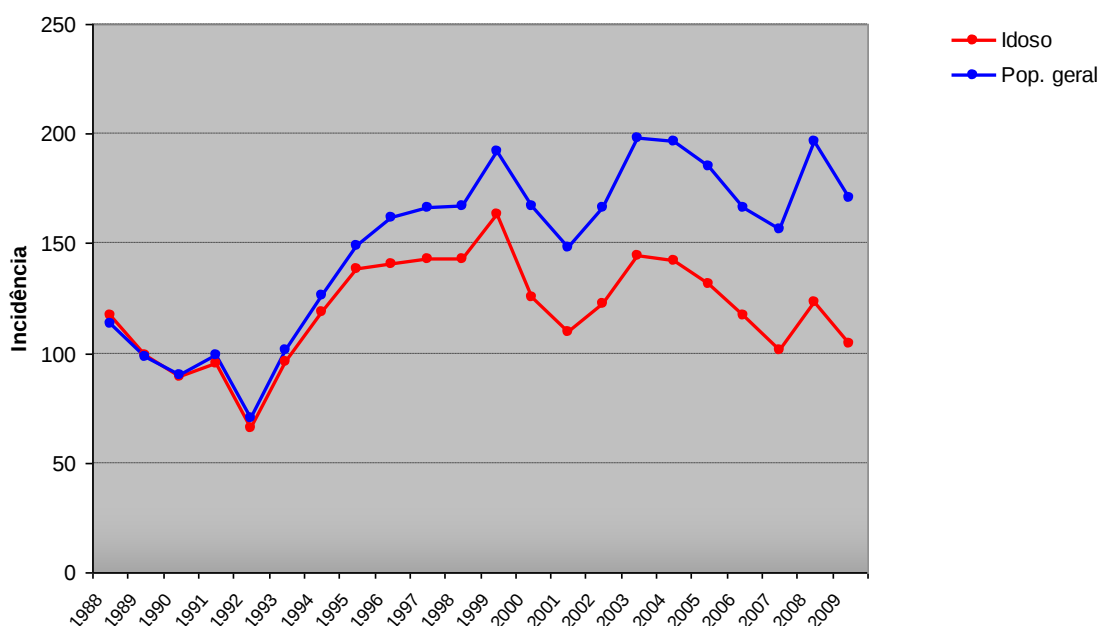


Figura 2. Série histórica da incidência de tuberculose em idosos com ou mais 60 anos, por todas as formas, e na população em geral na Cidade do Recife (PE) no período de 1988-2008.

Com o envelhecimento da população brasileira, a incidência da tuberculose começa a se deslocar para a população dos idosos (FERREIRA, 2005), podendo vir a constituir em um grave problema, principalmente se considerarmos que as taxas de letalidade tendem a aumentar com a idade (MURRAY et al., 1993 ; MISHIMA, 2005). Apesar disso, poucos estudos investigando o comportamento da tuberculose nessa população têm sido realizados no Brasil (VENDRAMINI et al 2003; CAVALCANTI, 2006; DOMINGOS, 2007).

Estima-se que haverá um agravamento da tuberculose nos próximos 20 anos, com aumento da prevalência de novas infecções, da incidência de casos e da letalidade



da doença (BRASIL, 2002). Dentre os fatores determinantes dessa situação, destaca-se a epidemia do HIV, presença de co-morbidades, o envelhecimento da população e formas clínicas da doença (ROSEMBERG, 2001; SELIG, 2004; OMS, 2006). Dos fatores relacionados ao aumento da ocorrência da tuberculose no idoso são ainda citados a imunodepressão, a desnutrição, o alcoolismo e tabagismo (VENDRAMINI et al 2003).

Estudos publicados reconhecem a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico da tuberculose no idoso devido a sua apresentação clínica freqüentemente atípica. Além disso, a realização e interpretação de exames complementares nessa população são particularmente difíceis, devido à freqüente presença de doenças associadas (FREITAS et al., 2002). Esses problemas são, em parte, decorrentes das alterações imunológicas próprias do envelhecimento (ROSEMBERG, 2001).

As células T regulatórias estão envolvidas na supressão de respostas imune aos microorganismos que invadem ou co-habitam o hospedeiro (BELKAID et al, 2002; HISAEDA et al, 2004; LUNDGREN et al, 2003), inclusive na tuberculose humana (FERRAZ et al, 2006).

As células T são responsáveis por dois processos: imunidade e hipersensibilidade. Nas situações de alta imunidade e pouca hipersensibilidade, a necrose não progride, é invadida por fibroblastos, e forma-se um nódulo residual que pode, em certas condições, evoluir para calcificação. Isso, porém não impede que dentro do aglomerado cicatricial permaneçam bacilos vivos quiescentes que, por sua vez,



manterão a situação com algum grau de hipersensibilidade, fato esse comprovado pela reação à tuberculina que permanece positiva (ROSEMBERG, 2001).

Estudos mostram que há uma menor reatividade do teste tuberculínico em idosos com TB doença quando comparados aos adultos jovens doentes (VANDEN & DEMEDTS, 1992; KORZENIEWSKA-KOSELA et al., 1994; DORKEN et al. , 1987 ; VENDRAMINI, 2003). Ao mesmo tempo, tem-se verificado um aumento no número de células T regulatórias com o avançar da idade, as quais exercem uma ação imunossupressora para infecção pelo *M. tuberculosis*, dentre outros agentes infecciosos (LEPOSAVIC et al, 2006). Além disso, poucos estudos dentre eles, o de Rosenberg (2001) e Loser et al (2007) sugerem que células T regulatórias atuam diretamente no sítio da inflamação/ infecção.

O estudo realizado por Cavalcanti et al (2006), em idosos com tuberculose na cidade do Recife (PE), contribuiu para o conhecimento das características clínicas e epidemiológicas dos idosos com tuberculose. Porém, o padrão imunológico e de resposta ao teste tuberculínico não foi estudado. Torna-se, portanto, necessário delinear uma investigação com parâmetros clínicos para responder às questões ainda não esclarecidas.

Pesquisas acerca do envelhecimento populacional e seu impacto sobre o padrão epidemiológico de doenças infecciosas precisam ser realizadas para que o conhecimento atualizado de sua ocorrência forneçam subsídios para os programas de controle. Nesse



sentido, a presente dissertação tem por objetivo geral estudar a resposta ao teste tuberculínico em idosos e sua correlação com indicadores indiretos da resposta imune.

A dissertação será apresentada na forma de três artigos: No primeiro realizou-se uma revisão bibliográfica dos estudos publicados sobre resposta imunológica relacionados ao desenvolvimento da tuberculose no idoso, particularmente sobre o papel das células T regulatórias (Tregs), e sua relação com a reatividade ao teste tuberculínico (TT). A revisão bibliográfica foi realizada mediante uma busca *on-line* nas bases de dados *Medline-PubMed*, *Science-Direct*, *Lilacs*, *Bireme* e *Scielo*, com foco nas publicações dos últimos dez anos, nos idiomas português e inglês. Os termos de busca utilizados foram: *Tuberculosis (TB)*; *Elderly*; *Aging*; *Tuberculin Reactivity*; *Purified Protein Derivative (PPD)*; *Immunity*; *Regulatory T cells CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*.

O segundo artigo relata os resultados de um estudo que descreveu o padrão de reatividade ao teste tuberculínico em um grupo de idosos com tuberculose doença, comparando-o com dois grupos: idosos sem tuberculose doença e adultos com tuberculose, verificando ainda as características de cada grupo.

O terceiro artigo teve como propósito descrever a correlação entre os níveis de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e a reatividade ao teste tuberculínico em idosos e adultos com tuberculose em atividade e idosos sem tuberculose doença.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito de um projeto de pesquisa mais amplo intitulado: “Estudo da tuberculose em populações especiais: Validação de métodos



diagnósticos em co-infectados pelo HIV, idosos e crianças e Avaliação da transmissão hospitalar da tuberculose e efeito do HAART em pacientes co-infectados pelo HIV”, financiada pelo CNPq processo número: nº 410567/2006-0 que teve por objetivo estudar a tuberculose em pacientes cuja doença é de difícil diagnóstico (crianças, HIV positivos e idosos).



REFERÊNCIAS



BELKAID, Y., PICCIRILLO. C.A., MENDEZ. S., SHEVACH, E.M, & SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature, v. 420, n. 6915, p. 502-507, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Funasa. Brasília, 2002.

CAVALCANTI, Z.R; ALBUQUERQUE, M.F.M; CAMPELO, A.N.R; XIMENES, R; MONTARROYOS, U; VERÇOSA; M.K.A. Características da tuberculose em idosos no Recife (PE): contribuição para o programa de controle. J Bras Pneumol, vol 32, n. 6, p. 535-43, 2006.

DATASUS/MS/SUS. Tuberculose- Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação- SINAN. Disponível em: <http://dtr2008.saude.gov.br/sinaweb/tabnet/dh?sinan/tuberculose/bases/tubercbr.def>. Acesso em 02 de dezembro de 2009.

DATASUS/MS/SUS. Informações de Saúde/ Demográficas e Sócio-econômicas. Censos- População residente de Pernambuco. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?ibge/cnv/poppb.def>. Acesso em 25 maio de 2010.

DOMINGOS, M.P. Tuberculose em Recife, PE- O efeito da estratégia DOTs (Directly Observed Treatment Short- course) e fatores associados ao óbito e ao abandono de tratamento,1996 a 2005. 2007. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FERRAZ, J. C., MELO, F. B. S., ALBUQUERQUE, M. F. P. M., MONTENEGRO, S. M. L. AND ABATH, F. G. C. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. Brazilian journal of medical and biological research. v. 39, p. 1387-1397, 2006.

FERREIRA, A.A.A; QUEIROZ, KCS; TORRES, KP; FERREIRA, MAF; ACCIOLY, H; ALVES, MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Rev. Saúde Pública, v. 8, n. 2, p.142-9, 2005.



FREITAS, E. V; PY,L; NERY, A L; CANÇADO, FAX; GORZONE, ML; ROCHA, SM. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan, 2002.

HISAEDA, H., MAEKAWA, Y., IWAKAWA, D., OKADA,H., HIMENO, K, KISHIHARA, K., TSUKUMO,K., TSUKUMO, S.I. & YASUTOMO ,K. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+CD25+ regulatory Tcells Nature Medicine, v.10, n.1, p.29-30, 2004.

KORZENIEWSKA-KOSELA M, KRYSL J, MULLER N, BLACK W, ALLEN E, FITZGERALD JM. Tuberculosis in young adults and the elderly. A prospective comparison study .Chest v. 106, n.6, p.28-32,1994.

LEPOSAVIC, G. et al. Age associated changes in CD90 expression on thymocytes and in TCR-dependent stages of thymocytes maturation in rats. Exp. Gerontol, v. 41, n. 6, p.574-589, 2006.

LOSER, K; BEISSERT, S. Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity. Adv Dermatol, v. 23, p. 307-33, 2007.

LUNDGREN, A. et al. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. Infection and Immunity, v. 71, n.4, p.1755-62, 2003.

MISHIMA, EO. Tuberculose pulmonar no idoso em comparação com a do adulto jovem. 2005. Tese (Doutorado em Saúde Pública) Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2005.

MURRAY, C.; STYBLO, K. & ROUILLON, A., 1993. Tuberculosis. In: Disease Control Priorities in Developing Countries (D. T. Jamison; W. H. Mosley; A. R. Measham & J. L. Bobadilla, eds.), pp. 233-258. New York: Oxford University Press.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. The Global Plan to Stop TB 2006–2015: actions for life toward a world free of tuberculosis. Genebra: WHO/CDS/TB, 2006. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso: 03.04. 2010.



ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - WHO Report 2009. Global tuberculosis control - a short update to the 2009 report. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso: 03.04. 2010.

RAVIGLIONE, M. C.; SNIDER Jr., D. E. & KOCHI A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA, v. 273. p. 220-226, 1995.

ROSEMBERG, José. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. Bol. Pneumol. Sanit., vol.9, no.1, p.35-59, 2001. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid. Acesso em 10 de julho de 2010.

SELIG L, BELO MT, TEIXEIRA EG CUNHA AJ, BRITO R, LUNA AL, et al. Óbitos atribuídos à tuberculose no Estado do Rio de Janeiro. J Bras Pneumol.v. 30, n. 4, p. 327-34, 2004.

SINAN/SES. GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, Secretaria Estadual de Saúde, Coordenação de Tuberculose do Estado de Pernambuco. Indicadores e informações do SINAN/MS/SUS. Disponível em: <http://dtr2008.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>. Acessado em: fevereiro de 2010.

VAN DEN BRANDE, P; DEMEDTS, M. Four-stage tuberculin testing in elderly subjects induces age-dependent progressive boosting. Chest v.101, n.2, p.447-50, 1992.

VENDRAMINI SHF, Villa TCS, Cardozo Gonzales RI, Monroe. A Tuberculose no idoso: análise do conceito. Rev Latino-Am. Enfermagem. v.11, n. 1, p. 96-103, 2003.



ARTIGO 1



ARTIGO DE REVISÃO

TUBERCULOSE NO IDOSO, PAPEL DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E A REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO.

BRITO, CMG¹; BRAGA,C²; PEREIRA, VRA⁴; CASTANHA PMS²; ALBUQUERQUE, MFPM^{1 3} CAMPELO ARL¹

1 DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA, CCS/UFPE

2 LABORATÓRIO DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS/ DEPTO DE PARASITOLOGIA/CPQAM/ FIOCRUZ

3 DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA/CPqAM/FIOCRUZ

4 LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA/DEPTO DE IMUNOLOGIA/CPQAM/ FIOCRUZ

Correspondência: Cintia Michele Gondim de Brito Lima
Estrada do Arraial, 2385, apt 1701-Tamarineira-52051360-Recife-Pernambuco
Fone: (81) 88273280- E-mail: cintiabri@yahoo.com.br



RESUMO

**TUBERCULOSE NO IDOSO: REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E NÍVEIS DE CÉLULAS T
REGULATÓRIAS**



O processo de envelhecimento é dinâmico e envolve modificações tanto morfológicas como funcionais, bioquímicas e psicológicas que determinam a progressiva perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e maior incidência de doenças. Particularmente no que se refere à tuberculose (TB), a população idosa (≥ 60 anos) apresenta marcante suscetibilidade ao adoecimento, tanto pela reativação de focos latentes quanto pela ocorrência de novas infecções, principalmente devido à diminuição da resposta imune celular que é afetada no processo de envelhecimento. Apesar disso, poucos estudos investigando o comportamento da tuberculose na população idosa têm sido realizados. Este trabalho tem como objetivo revisar os estudos publicados sobre fatores imunológicos relacionados ao desenvolvimento da tuberculose no idoso, particularmente o papel das células T regulatórias (T regs), e sua relação com a reatividade ao teste tuberculínico (TT). A revisão bibliográfica foi realizada mediante uma busca *on-line* nas bases de dados *Medline-PubMed*, *Science-Direct*, *Lilacs*, *Bireme* e *Scielo*, com foco nas publicações dos últimos dez anos, nos idiomas português e inglês. Os diversos estudos que foram analisados relatam que as células T regs exercem importante papel no controle da infecção tuberculosa que permitem a manutenção do equilíbrio entre a supressão da imunidade ao *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) e os mecanismos imunopatogênicos em pacientes com TB. Porém, poucos estudos têm avaliado o nível das células T regs na população idosa e a informação sobre essas células nesse grupo é limitada e controversa. As evidências existentes até o momento, demonstrada pela presente revisão, apontam que essas células podem ser menos funcionais no envelhecimento, levando a necessidade de altos números para manter a tolerância. Alternativamente, o envelhecimento dos indivíduos leva a uma redução da atividade dos linfócitos T e a infecção tuberculosa contribui para acentuar o estado de falência do sistema imunológico. Aliado a isso, chama atenção o fato que nos idosos, estudos mostram uma redução da reatividade do teste tuberculínico. No entanto, apenas um estudo foi encontrado na literatura que demonstrando a associação entre a intensidade da reatividade ao teste tuberculínico e os níveis de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+$) na população geriátrica. Nesse sentido, conclui-se que são escassos estudos que trate dessa temática e existe uma lacuna de informação no contexto da resposta ao TT e níveis de células T regs em idosos.

Palavras-chaves: Tuberculose, idoso, imunidade, células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ FOXP3⁺, Teste Tuberculínico.



ABSTRACT

**TUBERCULOSE NO IDOSO: REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E NÍVEIS DE CÉLULAS T
REGULATÓRIAS**



The aging process is dynamic and involves morphological, functional, biochemical and psychological changes that determine the progressive loss of adaptability of the individual to the environment, leading to greater vulnerability and greater incidence of diseases. Particularly with regard to tuberculosis (TB), the elderly population (≥ 60 years) shows marked susceptibility to illness, both through the reactivation of latent foci as the occurrence of new infections, mainly due to decreased cellular immune response that is affected in aging process. Nevertheless, few studies investigating the behavior of tuberculosis in the elderly have been conducted. This paper aims to review published studies on immunological factors related to development of tuberculosis in the elderly, particularly the role of regulatory T cells (T regs), and its relation to reactivity to the tuberculin test (TT). The literature review was conducted by an online search in Medline, PubMed, Science-Direct, Lilacs, and Scielo Bireme, focusing on publications of the last ten years, in Portuguese and English. The various studies that were reviewed reported that T cells regs play an important role in controlling tuberculosis infection that allow the maintenance of equilibrium between the suppression of immunity to *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) and immunopathogenic mechanisms in patients with TB. However, few studies have assessed the level of T cells regs in the elderly population and information on such cells in this group is limited and controversial. The evidence available so far, demonstrated by this review, indicate that these cells may be less functional in aging, leading to high numbers need to maintain tolerance. Alternatively, the aging of individuals leads to a decreased activity of T lymphocytes and tuberculosis infection contributes to enhance the status of the collapse of the immune system. Allied to this, is noteworthy that in the elderly, studies show a reduced reactivity of the tuberculin test. However, only one study was found in the literature demonstrating the association between the intensity of tuberculin skin test reactivity and levels of regulatory T cells ($CD4^+CD25^+$) in the geriatric population. Accordingly, it is concluded that there are few studies that addresses this subject and there is an information gap in the context of the response to TT and T cell levels in elderly.

Keywords: Tuberculosis, elderly, immunity, regulatory T cells $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, Tuberculin Test.



INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) permanece como um problema de saúde pública de abrangência mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento. As estimativas indicam que o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), o agente etiológico da doença, infecta 2,0 bilhões de pessoas em todo mundo (Raviglione, 1995; OPS, 2002, OMS, 2006). Isso significa que cerca de um terço da população mundial alberga a micobactéria sem manifestar sintomas da doença e com risco de progredir para doença ativa (Rosemberg, 2001). Estes dados inferem que, nos próximos 50 anos deverá ocorrer um expressivo aumento dos casos da TB em idosos, que poderá aumentar de 5% para 14% (Chaimowicz, 2001).

Atualmente, uma em cada dez pessoas no mundo tem 60 anos de idade ou mais e estima-se que em 2.050 essa relação seja de 1:5 e o número de centenários aumentará 15 vezes em relação ao ano de 1999 (IBGE, 2005). O Brasil é considerado um país em processo de envelhecimento, sendo 9% da população atual composta por indivíduos idosos (Brasil, 2004).

A incidência da tuberculose no Brasil, que começa a se deslocar para a população dos idosos (Ferreira, 2005), pode vir a constituir um grave problema, principalmente se considerarmos que as taxas de letalidade tendem a aumentar com a idade (Murray et al., 1993; Mishima, 2005). Apesar disso, poucos estudos investigando o comportamento da tuberculose na população idosa têm sido realizados (Vendramini et al 2003; Cavalcanti, 2006; Domingos, 2007).

Esse trabalho tem como objetivo revisar os estudos publicados na literatura, nos últimos 10 anos, sobre os fatores imunológicos relacionados ao desenvolvimento da tuberculose no idoso, particularmente o papel das células T regulatórias (Tregs), e sua relação com a reatividade ao teste tuberculínico (TT).

A revisão bibliográfica foi realizada a partir da busca *on-line* por publicações nos idiomas português e inglês, nas bases de dados *Medline-PubMed*, *Science-Direct*, *Lilacs*, *Bireme* e *SciELO*. A busca enfocou artigos publicados nos últimos dez anos. Com exceção dos artigos relacionados à reatividade ao teste tuberculínico, cuja pesquisa - devido à reduzida produção científica sobre o tema - abrangeu o período correspondente aos últimos vinte anos. Os termos de busca utilizados foram: *Tuberculosis* (TB); *Elderly*; *Aging*; *Tuberculin Reactivity*; *Purified Protein Derivative* (PPD); *Immunity*; *Regulatory T cells CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺*.



RESPOSTA IMUNE À TUBERCULOSE E ENVELHECIMENTO

A resposta imune à infecção pelo *M. Tuberculosis* envolve a interação de células especializadas, que englobam o sistema macrófago-célula T. As células T CD4⁺ e CD8⁺ têm como função o reconhecimento de antígenos e outros constituintes do bacilo, para elaborarem as citocinas que ativam os macrófagos (Rosemberg, 2001). Macrófagos residentes no tecido compõem uma das primeiras barreiras de defesa frente à micobactéria. Essas células fagocitam e processam os antígenos do bacilo, apresentando-os aos linfócitos T auxiliares (CD4⁺) através do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II, presente unicamente nos macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (também denominados células apresentadoras de antígenos).

As células CD4⁺ do tipo 1 (Th1), por contribuírem na produção da interleucina (IL-2) e de interferon gama (IFN- γ) que são os mais atuantes ativadores dos macrófagos, desempenham a função principal na resposta imune à micobactéria. As células T-citotóxicas (CD8⁺) reconhecem antígenos oriundos do citoplasma e igualmente participam da resposta imune ao *M. tuberculosis*, sendo capazes de reconhecer fragmentos peptídicos ligados através do MHC de classe I, moléculas que são expressas em praticamente todas as células diferenciadas ou maduras do organismo (Rosemberg, 2001; Teixeira, 2007).

Diversas linhagens de células T têm sido caracterizadas, dentre essas, as células T regs que se tornaram um recente alvo de investigações imunológicas, em virtude de sua identificação, em modelos humanos e animais (Hori *et al*, 2003; Aschenbrenner *et al*, 2007).

As células Tregs são um subtipo de células T CD4⁺ que atuam na regulação da resposta imune em humanos e ratos. Essas células são responsáveis pela manutenção da homeostase, controle da autoimunidade e imunidade tumoral. As células T regs regulam os níveis de ativação, proliferação e produção de citocinas pelas células T efectoras, assim como atuam no controle da função imune de células dendríticas (Baecher-Allan, 2001; Shevac *et al*, 2001; De Jong, 2004; North & Jung, 2004; Lages, 2008).

As células T regs são desenvolvidas no timo e representam cerca de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas, sendo usualmente caracterizadas por alta expressão do marcador CD25, embora expressem diversos outros marcadores imunológicos, alguns deles comuns aos das células T CD4⁺ (Sakaguchi, 2004). Entre os marcadores utilizados na identificação das células T regs, estão os CTLA-4, GITR, CD45RO⁺ que são marcadores auxiliares presentes em populações T regs naturais (Baecher-Allan, 2004).

A recente identificação de um gene expresso nas células T reguladoras humanas e de camundongos facilitou a caracterização dessa subpopulação celular (Aschenbrenner *et al*, 2007). Esse gene, denominado *forkhead Box p3* ou FOXP3, é um fator de transcrição ativado apenas nas células T regulatórias (Hori *et al*, 2003; Khattri



et al, 2003). O FOXP3 controla o desenvolvimento e a expressão do fenótipo supressivo nas células T regs $CD4^+CD25^+$ (Hori *et al*, 2003), sendo considerado o mais específico marcador para identificação dessas células (Sakaguchi, 2005).

Células T regs naturais modulam respostas às infecções microbianas crônicas ou latentes em humanos. Como exemplo, ao contrário do que ocorre com indivíduos saudáveis, a resposta de células de memória $CD4^+$ específicas para *Helicobacter pylori* está reduzida em indivíduos infectados, sendo este fato diretamente relacionado à produção de células T regs naturais *Helicobacter pylori* específicas que inibem a atividade de células de memória contra a bactéria (Lundgren, 2003). Infecções crônicas por citomegalovírus e HIV induzem a produção de células T regs naturais para respostas imunes antivirais (Aandahl, 2004; Kinter, 2004).

A ativação de células T regs naturais contribui para evitar a resposta inflamatória excessiva do hospedeiro, em certas infecções. Por outro lado, a sua ativação também pode favorecer a manutenção do patógeno, seja na doença crônica, seja no estado de latência (Delgado *et al*, 2002; Goldfeld *et al*, 2004).

Estudos experimentais em camundongos mostraram que o aumento de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ se relaciona com a maior vulnerabilidade a infecções, sugerindo assim o envolvimento dessas células em processos infecciosos (Hori *et al*, 2003). A ação dessas células durante a resposta imune tem sido demonstrada tanto em camundongos desprovidos de células $CD4^+$, como em indivíduos HIV positivos (De Jong, 2004). Em seres humanos, o aumento da expressão de células T tem sido relacionado à redução da eficácia da vacinação com Bacilo de Calmette e Guérin (BCG) (Weir, 2004).

As células T regs exercem importante papel na infecção tuberculosa. Essas células permitem a manutenção do equilíbrio entre a supressão da imunidade ao *M. tuberculosis* e os mecanismos imunopatogênicos em pacientes com TB (Guyot-Revol *et al*, 2006; Chiacchio *et al*, 2009).

Estudos acerca da relação entre as células T regulatórias e tuberculose indicam que a frequência de células T regs está significativamente aumentada no sangue de pacientes com TB ativa comparado com o sangue de doadores saudáveis (Guyot-Revol *et al*, 2006; Ribeiro-Rodrigues *et al*, 2006; Chen *et al*, 2007; Chiacchio *et al*, 2009). Essas células aumentam durante a tuberculose infecção e tem sido funcionalmente caracterizadas por sua habilidade para suprimir a imunidade específica ao *M. tuberculosis*, mediante a inibição da produção de citocinas como IFN γ e IL 10 (Chen *et al*, 2007).

O aumento nas frequências de células T regs observado na tuberculose ativa é mantido mesmo durante o tratamento para a doença (Ribeiro-Rodrigues *et al*, 2006; Chen *et al*, 2007). No entanto, após uma terapia anti-tuberculose bem sucedida, a frequência dessas células decresce para o nível observado em doadores saudáveis (Chen *et al*, 2007).

O aumento de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ durante a tuberculose parece constituir um mecanismo de adaptação do organismo para contrabalançar a intensa



resposta inflamatória, principalmente em locais de infecção ativa pelo *M. tuberculosis*, como o pulmão (Guyot-Revol et al, 2006; Chiacchio et al, 2009). No entanto, as mesmas propriedades imunoregulatórias podem então, paradoxalmente, deprimir as respostas das células T efetoras necessárias para o controle da infecção, tais como a produção de IFN- γ (Ribeiro-Rodrigues et al, 2006).

O processo de envelhecimento é dinâmico e envolve modificações tanto morfológicas como funcionais, bioquímicas e psicológicas que determinam a progressiva perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e maior incidência de doenças (Rosemberg, 2001).

Particularmente no que se refere à TB, a população geriátrica apresenta marcante suscetibilidade ao adoecimento, tanto pela reativação de focos latentes quanto pela ocorrência de novas infecções, principalmente devido à diminuição da resposta imune celular que é afetada no processo de envelhecimento (Gavazzi et al, 2002). Além disso, devido à transmissão da tuberculose ocorrer preferencialmente pelas vias aéreas, a redução dos mecanismos de defesa, como barreiras físicas, anergia ou pela ação de células reguladoras, contribuem para aumentar a vulnerabilidade do grupo à infecção tuberculosa (Rajagopalan et al, 2001; Chaimowicz, 2002).

O envelhecimento leva a uma redução da atividade dos linfócitos T (Rosemberg, 2001), favorecendo a ocorrência de doenças infecciosas, inclusive a TB, que tem a resposta imune celular como um dos principais responsáveis pelo controle da infecção (Chaimowicz, 2010). Além disso, a infecção tuberculosa contribui para acentuar o estado de falência do sistema imunológico (Rosemberg, 2001). Semelhante ao que ocorre com os portadores do vírus HIV, a imunodepressão gerada pelo processo de envelhecimento, favorece a multiplicação de bacilos enclausurados no granuloma e, conseqüentemente, a reativação da TB (reativação endógena). Diferentemente, a reinfecção (exógena) pelo *M. tuberculosis* é o mecanismo imunopatogênico mais observado nos imunocompetentes (Chaimowicz, 2001).

A idade avançada provoca alterações nos mecanismos que envolvem a geração da resposta imune e contribuem para o aumento do risco de infecções na população idosa (Hwang et al, 2009). Diversos distúrbios, como doenças auto-imunes, infecções crônicas e câncer têm sido associados com alterações nas células T regs (Dejaco et al, 2006; Lages et al, 2008; Tenorio et al, 2009). Apesar de muitos desses agravos acometerem com maior frequência a população idosa, estudos que investiguem a influência do envelhecimento na ocorrência e/ou função das células T regs ainda são escassos (Dejaco et al, 2006).

Apenas poucos estudos têm avaliado o nível das células T regs na população idosa e a informação sobre essas células é limitada e controversa. Estudos prévios usando a expressão do marcador CD25 para caracterizar as células T regs têm registrado níveis similares de células T regs em idosos, quando comparados a adultos (Greeg et al, 2005; Valmori & Melo, 2005). Contudo, evidências mais recentes apontam para um



aumento na frequência dessas células em indivíduos idosos e uma correlação linear entre o número de células T regs e idade (Greeg et al, 2005; Dejacó et al 2006; Lajes et al, 2008; Haynes, 2009). Níveis elevados de T regs podem causar aumento da supressão de células T pró-inflamatórias e assim contribuir para o aumento da susceptibilidade a infecções, risco de neoplasia e resposta deficiente a vacina em indivíduos idosos (Dejacó et al, 2006).

As células T regs podem ser menos funcionais no envelhecimento, levando a necessidade de altos números para manter a tolerância (Dejacó et al, 2006). Alternativamente, o envelhecimento dos indivíduos leva a uma redução da atividade dos linfócitos T e a infecção tuberculosa contribui para acentuar o estado de falência do sistema imunológico (Rosemberg, 2001).

Embora a expressão do fator de transcrição FOXP3⁺ venha sendo atualmente utilizada para identificar a proporção de células T regs em humanos (Talal et al, 2005; Burl et al, 2007; James et al, 2007; Hougardy et al, 2007), o conhecimento a respeito da manutenção da atividade supressora dessas células no idoso permanece confuso. Assim, alguns estudos mostram manutenção da atividade supressora em humanos e camundongos idosos (Greeg et al, 2005; Sharma et al, 2006; Lages et al 2008), enquanto outros registram decréscimo na supressão mediada por células T regs em ratos e humanos mais velhos (Tsaknaridis et al, 2003; Zhao et al, 2007).

As discordâncias observadas entre os estudos que investigam a relação entre indivíduos idosos e frequência e função de células T regs estão possivelmente relacionadas às diferenças nas técnicas de fenotipagem e/ou as características da população de estudo, tais como média de idade, *status* de saúde ou critérios de inclusão/exclusão (Lages et al, 2008).

Na população idosa, evidências científicas apontam para uma redução na atividade de células T efectoras e aumento na população de células T regulatórias (Greeg et al, 2005; Dejacó et al 2006; Lajes et al, 2008; Haynes, 2009). Porém outros registram decréscimo no número de células T regs em indivíduos mais velhos (Tsaknaridis et al, 2003; Zhao et al, 2007).

Essas alterações imunológicas, aliadas a fatores associados como comorbidades, hábitos de vida e dificuldade de diagnóstico, tornam esse grupo susceptível a doenças infecciosas, como a TB (Freitas et al, 2002; Vendraminni et al, 2003).

Com base nesses dados, é possível que no idoso com TB níveis de células T regs estejam alterados e esses possam influenciar na resposta imune ao bacilo, na manutenção do patógeno e na progressão para a doença.



ENVELHECIMENTO E REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO

O teste tuberculínico tem sido utilizado como método auxiliar no diagnóstico da infecção, porém não é suficiente para o diagnóstico da TB doença. O teste tuberculínico é utilizado fundamentalmente para a identificação da infecção pelo *M. tuberculosis* e como método de triagem para o diagnóstico da TB latente em crianças e em pacientes soropositivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Silva Jr, 2004; Pai et al., 2005).

O TT desenvolvido originalmente por Robert Koch, com a evolução foi criada a PPD (protein purified derivative), expressa de acordo com a técnica de Mantoux (1908) pelo surgimento de uma reação maculo-papular local ocasionada pelo acúmulo de células inflamatórias na pele, que surge 24 a 72 h após a inoculação intradérmica de PPD. A tuberculina, utilizada no Brasil é a PPD-RT23 (preparada pelo STATENS SERUM INSTITUTE, COPENHAGEN), é uma mistura de proteínas de baixo peso molecular que é aplicada por via intradérmica no antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml. Uma enduração de 5 a 15 mm, dependendo dos fatores de risco do indivíduo, é considerada um resultado positivo e indica infecção por micobactérias (Teixeira et al, 2007).

O TT é realizado com base na definição de um ponto de corte para o tamanho da reação cutânea, acima do qual o PPD é considerado positivo (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2000; Silva Jr, 2004). Assim, classifica-se como:

- 0 a 4 mm: não reator;
- 5 a 9 mm - reator fraco: indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias;
- 10 mm ou mais - reator forte: indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis*, que pode estar doente ou não, e indivíduos vacinados com BCG nos últimos dois anos.

A realização da prova tuberculínica pode auxiliar no conhecimento do grau da detecção da infecção pelo *M. tuberculosis* (Maciel, 1999). Entretanto, por ter baixa especificidade, pois tanto a vacinação BCG quanto a exposição às micobactérias não tuberculosas podem induzir resposta ao TT similar àquela produzida pela infecção pelo *M. tuberculosis*, esse teste tem sido pouco utilizado na confirmação diagnóstica da TB (Andersen et al., 2000).

Nos indivíduos infectados pelo vírus HIV, considera-se reator aquele que apresenta enduração de 5 mm ou mais (Silva Jr, 2004). Naqueles vacinados com BCG, sobretudo entre aqueles imunizados há até dois anos, a prova tuberculínica deve ser interpretada com cautela porque, em geral, apresenta reações de tamanho médio podendo alcançar 10 mm ou mais (Silva Jr, 2004). Além disso, a variabilidade de leitura inter e intra-observador, a necessidade de pessoal treinado e do retorno do paciente para a leitura da enduração torna ainda mais complicada a sua utilização como teste de triagem (Pai et al., 2005). Devido à sua baixa acurácia, embora o TT seja



ocasionalmente utilizado no diagnóstico para a detecção de infecção tuberculosa latente (ITBL) (Furin, 2005).

Algumas circunstâncias podem interferir no resultado da prova tuberculínica levando a resultados negativos, como as doenças imunossupressoras (sarcoidose, síndrome da imunodeficiência adquirida, neoplasias), tratamentos com corticosteróides e drogas imunossupressoras, gravidez, crianças abaixo de dois anos e idosos acima de 60 anos (Silva Jr, 2004).

A resposta imune na TB é algumas vezes caracterizada por imunidade reduzida, particularmente na doença avançada, como demonstrada pela produção diminuída de IL-2 e IFN- γ e anergia antígeno-específica a preparações de PPD (Goldfeld et al, 2004; Delgado et al, 2002). A anergia ao PPD induz uma leitura negativa do teste tuberculínico, podendo ocorrer em alguns indivíduos com tuberculose pulmonar ativa, e que pode ser correlacionada com a expansão de células T (Goldfeld, 2004). Esse fenômeno é observado com frequência em doenças microbianas crônicas envolvendo a participação de células T supressoras (Baecher-Allan, 2004).

As células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ estão presentes na epiderme de humanos (Ring et al, 2006; Loser et al, 2007). O aumento na frequência das células T regs, após estimulação antigênica localizada, reflete a proliferação de células desse tipo residentes na pele e que apresentam marcadores fenotípicos e funcionais das células T regs naturais, (Clark et al, 2007; Vukmanovic-Stejic et al, 2008).

As informações a respeito da relação entre as células T regs presentes na epiderme e a reação de hipersensibilidade ao PPD são limitadas (Guyot-Revol et al 2006; Mahan, et al, 2008; Vukmanovic-Stejic et al, 2008).

A atividade supressora das células T regulatórias é aumentada com a adição do PPD, o que sugere que a tuberculina pode ativar as células T regs antígeno específicas (Mahan, et al, 2008). A estimulação antigênica com tuberculina na pele de voluntários saudáveis, com histórico de vacinação com BCG, mostra que a cinética de acúmulo e proliferação de células T regulatórias CD4⁺ FOXP3⁺ são similares as células T de memória nesse sítio inflamatório. A relação entre essas populações celulares sugere que a proliferação de células T de memória é controlada pelas células T regs nos sítios periféricos (Ring et al, 2006; Loser et al, 2007). Esse equilíbrio seria responsável por manter a resposta imune controlada e a desregulação nesse balanço tem sido identificada em situações patológicas (Vukmanovic-Stejic et al, 2008).

As células T regs são geralmente associadas com TB ativa. Essas células estão aumentadas no sangue e sítios de doença em pacientes com tuberculose (Guyot-Revol et al, 2006; Ribeiro-Rodrigues et al, 2006; Chen et al, 2007; Chiacchio et al, 2009). Embora a citocina regulatória IL 10 seja associada à anergia cutânea na resposta imune celular antígeno específica na tuberculose, pouco é conhecido sobre a relação entre a anergia ao PPD e a produção de células T regs. Somente um estudo mostra, secundariamente, que apesar das células T regs estarem expandidas no sangue de



pacientes com TB ativa, apenas 2 dos 27 pacientes estudados com TB tiveram anergia a resposta ao teste tuberculínico (Guyot-Revol et al, 2006).

No processo de envelhecimento, é observado um declínio da imunidade mediada por células T (Greeg et al, 2005; Dejacó et al 2006; Lajes et al, 2008; Haynes, 2009) em indivíduos com tuberculose (Trzonkowski, 2005; Leposavic et al, 2006). Aliado a isso, nos idosos, diversos estudos mostram uma redução da reatividade do teste tuberculínico (Dorken et al. , 1987; Tsai et al., 1991; Vanden & Demedts, 1992; Korzeniewska-Kosela et al., 1994).

No entanto, estudos que demonstrem a associação entre a intensidade da reatividade ao teste tuberculínico e os níveis de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+$) na população geriátrica são escassos. Nesse sentido existe uma lacuna de informação no contexto da resposta ao TT e produção de células T regs em idosos.

O estudo das células T regulatórias tem aberto possibilidades de tratamento imunológicos, através de manipulação da resposta imune com intenção de favorecer a eliminação definitiva de importantes agentes patogênicos de enfermidades crônicas humanas como o HIV, vírus da hepatite C, parasitos causadores da malária, leishmaniose e possivelmente *M. tuberculosis* (Lages et al, 2008).

A manipulação de células T regs *in vitro* também mostra a possibilidade de reintrodução dessas células nos seus doadores, podendo vir a ser uma estratégia terapêutica para prevenir inflamações, rejeição de transplantes ou respostas auto-imunes.

Apesar da relevância do papel das células Tregs e da possibilidade de seu uso na estratégia terapêutica, essas ainda são alvo de poucos estudos, possivelmente por esse ser um tema só recentemente abordado em pesquisas científicas. Assim, existe a necessidade de mais estudos que investiguem o papel e função dessas células, principalmente em grupos prioritários como os idosos, acometidos ou não pela tuberculose.

REFERÊNCIAS

AANDAHL E.M.,MICHAELSSON, J., MORETO,W.J.,HECHT,F.M. & NIXON,D.F. Human $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells control T cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. The Journal of Virology, v.78, p. 2454-9, 2004.

ANDERSEN, P. et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet, v. 23, p. 1099-1104, 2000.

ASCHENBRENNER K, D'CRUZ LM, VOLLMANN EH, HINTERBERGER M, EMMERICH J, SWEE LK, ROLINK A, KLEIN L. Selection of Foxp3(+) regulatory T



cells specific for self antigen expressed and presented by Aire(+) medullary thymic epithelial cells. Nat Immunol., v. 8, n. 4, p. 351-8, 2007.

BAECHER-ALLAN, C. & HAFLER, D.A. Supressor T cells in human diseases. The journal of Experimental Medicine, v. 200, p. 273-6, 2004.

BAECHER-ALLAN, C., WOLF, E. & HAFLER, D.A. Functional analysis of highly defined, FACS- isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. Clinical Immunology, v. 115, p.10-18, 2005.

BURL, S., HILL, P. C., JEFFRIES, D. J., HOLLAND, M. J., FOX, A., LUGOS, M. D., ADEGBOLA, R. A., ROOK, G. A., ZUMLA, A. MCADAM K. P. W. J. AND BROOKS R. H. Foxp3 gene expression in a tuberculosis case contact study. Clinical and experimental immunology. v. 149, p.117-122, 2007.

CAVALCANTI, Z.R; ALBUQUERQUE, M.F.M; CAMPELO, A.N.R; XIMENES, R; MONTARROYOS, U; VERÇOSA; M.K.A. Características da tuberculose em idosos no Recife (PE): contribuição para o programa de controle. J Bras Pneumol., v. 32, n. 6, p. 535-43, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, v. 49 (RR-6), p.1-5, 2000.

CHAIMOWICZ, F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in brazil. Rev saúde pública, v. 35, p. 81-87, 2001.

CHAIMOWICZ F. Tuberculose pulmonar. In: Freitas EV, Py L, Nery AL, Cançado FAX, Gorzone ML, Rocha SM. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 362-73. 2002.

CHAIMOWICZ, F. Pulmonary tuberculosis in older people. Part II: Clinical presentation and diagnosis. Artigo de Revisão, p. 245- 251, 2010. Disponível em: http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=1785. Acessado em 24 de maio de 2010.

CHEN, X., ZHOU, B., LI, M., DENG, Q., WU, X., LE, X., WU, CHI., LARMONIER, N., ZANG, W., ZHANG, H., WAANG, H., KATSANIS, E. Cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells suppress mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clinical Immunology, v. 123, p.50-59, 2007.



CHIACHIO, T., CASETTI, R., BUTERA, O., VANINI, V., CARRARA, S., GIRARDI, E., DI MITRI, D., BATTISTINI, L., MARTINI, F., BORSELLINO G ; GOLETTI, D. Characterization of regulatory T cells identified as CD4+CD25+CD39+ in patients with active tuberculosis. Clinical & Experimental Immunology, v. 156, p. 463-470, 2009.

CLARK, R.A. AND KUPPER, T.S. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. Blood, v. 109, p. 194-202, 2007.

DELGADO J.C et al. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. Proc Natl Acad Sci USA, v. 99, n.11, p.7576-7581, 2002.

DEJACO, C., DUFTNER, C., SCHIRMER, M. Are regulatory t – cells linked with aging? Experimental gerontology. v. 41, p. 339-345, 2006.

DE JONG, B.C,ISRAELSKI, D.M., CORBETT, E.L & SMALL, P.M..Clinical management of tuberculosis in the context of HIV infection. Annual Review of Medicine, v. 55, p.283-301, 2004.

DOMINGOS, M.P. Tuberculose em Recife, PE- O efeito da estratégia DOTs (Directly Observed Treatment Short- course) e fatores associados ao óbito e ao abandono de tratamento,1996 a 2005. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DORKEN, E; GRZYBOWSKI, S; ALLEN, E.A. Significance of the tuberculin test in the elderly. Chest, v. 92, n. 2, p.237-40, 1987.

FERREIRA, A.A.A; QUEIROZ, KCS; TORRES, KP; FERREIRA, MAF; ACCIOLY, H; ALVES, MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Rev. Saúde Pública v. 8, n. 2, p.142-9, 2005.

FREITAS, E. V; PY,L; NERY, A L; CANÇADO, FAX; GORZONE, ML; ROCHA, SM. Tratado de Geriatria e Gerontologia. p. 362-73. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2002.

FURIN, J.J.; JOHNSON, J.L. Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. Current Opinion in Pulmonary Medicine, v. 11, p. 189-194, 2005.



GAVAZZI G, KRAUSE KH. Ageing and infection. Lancet Infect Dis., v. 2 , n. 11, p. 665-60, 2002.

GOLDFELD, A.E. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. Tuberculosis, v. 84, p. 76-81, 2004.

GREGG, R., C. M. SMITH, F. J. CLARK, D. DUNNION, N. KHAN, R. CHAKRAVERTY, L. NAYAK, AND P. A. MOSS. The number of human peripheral blood CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells increases with age. Clin. Exp. Immunol., v. 140, p. 540–546, 2005.

GUYOT- REVOL., INNES, J. A., HACKFORTH, S., AND LALVANI, A. Regulatory t cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine, v. 173, p.803-810, 2006.

HAYNES, L., AND MAUE, A. C. Effects of aging on t cell function. Current opinion in immunology, v. 21, p. 414-417, 2009.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. Science, v. 299, n. 5609, p.1057-61, 2003.

HOUGARDY, J. M., PLACE, S., HILDEBRAND, M., DROWART, A., DEBRIE A. S., LOCHT C. AND MASCART F. Regulatory t cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine, v. 176, p. 409-416, 2007.

HWANG, K. A., KIM, H. R., KANG, I. Aging and human CD4⁺ regulatory T cells. Mechanisms of ageing and development, v. 130, p. 509-517, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Perfil dos idosos responsáveis pelos domicílios no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.shtm, acesso em: junho 2010.

KHATTRI R, COX T, YASAYKO SA, RAMSDELL F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. Nat Immunol., v. 4, n. 4, p. 337-42, 2003.

KINTER, A. L. et al. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4⁺ and CD8⁺ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favourable clinical markers of disease status. The Journal of Experimental Medicine, v. 200, n. 3, p. 331-43, 2004.



KORZENIEWSKA-KOSELA M, KRYSL J, MULLER N, BLACK W, ALLEN E, FITZGERALD JM. Tuberculosis in young adults and the elderly: A prospective comparison study. Chest, v. 106, n. 6, p.28-32, 1994.

LAGES, C.S., SUFFIA, I., VELILLA, P.A., HUANG, B., WARSHAW, G., HILDEMAN, D.A., BELKAID, Y., CHOUGNET, C. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. The Journal of Immunology, v. 181, p. 1835-1848, 2008.

LEPOSAVIC, G. et al. Age associated changes in CD90 expression on thymocytes and in TCR-dependent stages of thymocytes maturation in rats. Exp. Gerontol, v. 41, n. 6, p. 574-589, 2006.

LOSER, K; BEISSERT, S. Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity. Adv Dermatol., v. 23, p. 307-33, 2007.

LUNDGREN, A. et al. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. Infection and Immunity, v. 71, n. 4, p.1755-62, 2003.

MACIEL ELN. Infecção por Mycobacterium tuberculosis em estudantes de enfermagem: um estudo de incidência através do Teste PPD / The incidence of infection by Mycobacterium tuberculosis in nursing students. Rio de Janeiro; s.n; jan. Rev Soc Bras Med Trop. p.79, 1999.

MAHAN, C. S., THOMAS, J.J., BOOM, W. H. AND ROJAS R. E. Cd4+cd25+ fop3+ regulatory t cell downregulate human v62+ t – lymphocyte function triggered by anti – cd3 or phosphoantigen. British society for immunology, v. 127, p. 398-407, 2008.

MANTOUX, C. Intradermo-réaction de la tuberculine. Comptes rendus de l'Académie des sciences, Paris, 1908, 147: 355-57 apud. Disponível em: <http://www.whonamedit.com/synd.cfm/2767.html>. Acesso: 01 nov. 2005.

MISHIMA, EO. Tuberculose pulmonar no idoso em comparação com a do adulto jovem. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2005. 121 p.

MURRAY, C.; STYBLO, K. & ROUILLON, A., 1993. Tuberculosis. In: Disease Control Priorities in Developing Countries (D. T. Jamison; W. H. Mosley; A. R. Measham & J. L. Bobadilla, eds.), pp. 233-258. New York: Oxford University Press.



NORTH,R.J. & JUNG, Y.J. Immunity to tuberculosis. Annual Review of Immunology, v. 22,p. 599-623, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. The Global Plan to Stop TB 2006–2015: actions for life toward a world free of tuberculosis. Geneva: WHO/CDS/TB,2006. 167p.

PAI, M et al. Mycobacterium tuberculosis Infection in Health Care Workers in Rural India: Comparison of a Whole-Blood Interferon [gamma] Assay with Tuberculin Skin Testing. JAMA, v. 293, p. 2746-2755, 2005.

RAJAGOPALAN S. Tuberculosis and aging: a global health problem. Clin Infect Dis., v. 33, n. 7, p. 1034-9, 2001.

RAVIGLIONE, M. C.; SNIDER Jr., D. E. & KOCHI A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA, v. 273: 220-226, 1995.

RIBEIRO-RODRIGUES., CO, T. R., ROJAS, R., TOOSI, Z., DIETZE, R., BOOM, W. H., MACIEL, E. AND HIRSCH. A role for CD 4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. Clinical and experimental immunology, v. 144, p. 25 – 34, 2006.

RING S., SCHÄFER S. G., MAHNKE K., LEHR H. A; ENK H. A. Cd4+cd25 regulatory t cells supprss contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector t cell into inflamed tissue. European journal immunomodulation, v.36, p. 2981-2992, 2006.

ROSEMBERG, José. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. Bol. Pneumol. Sanit. [online], vol.9, no.1, p.35-59, 2001. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-, acesso em: junho de 2010.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Ann Rev Immunol, v. 22, p. 531-562, 2004.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat. Immunol., v. 6, p. 345–352, 2005.



SHARMA, S., A. L. DOMINGUEZ, AND J. LUSTGARTEN. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. J. Immunol., v. 177, p. 8348–8355, 2006.

SHEVAC, EM., MCHUGH, RS., PICCIRILLO, C.A., THORNTON, A.M. Control of T cell activation by CD4⁺ CD25⁺ supressor T cells. Immunology Rev., v. 182, p. 58-67, 2001.

SILVA JR, J.B. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Jornal Brasileiro de Pneumologia, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180637132004000700003&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 22 nov. 2009.

TEIXEIRA, H. C., ABRAMO, C., MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. J Bra Pneumol., p. 323-334, 2007.

TENORIO, A. R., SPRITZLER, J., MARTINSON, J., GICHINGA, C. N., POLLARD, R. B., LEDERMAN, M. M., KALAYJIAN, R. C., LANDAY, A. L. The effect of aging on t – regulatory cell frequency in hiv infection. Clinical immunology, v. 130, p. 298-303, 2009.

TSAKNARIDIS, L., SPENCER, L., CULBERTSON, N., HICKS, K., TOCHA, D.L., CHOU, Y. K., WHITHAM, R. H., BAKKE, A., JONES, R. E., OFFNER, H., BOURDETTE, D. N., AND VANDENBARK, A. A. Functional assay for human cd4⁺cd25⁺ treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. Journal of neuroscience research, v. 74, p. 296-308, 2003.

VAN DEN BRANDE, P; DEMEDTS, M. Four-stage tuberculin testing in elderly subjects induces age-dependent progressive boosting. Chest, v.101, n.2, p.447-50, 1992.

VALMORI, D., A. MERLO, N. E. SOULEIMANIAN, C. S. HESDORFFER, AND M. AYYOUB. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. J. Clin. Invest., v. 115, p. 1953–1962, 2005.

VENDRAMINI SHF, Villa TCS, Cardozo Gonzales RI, Monroe A Tuberculose no idoso: análise do conceito. Rev Latino-am Enfermagem, v. 11, n. 1, p. 96-103, 2003.

VUKMANOVIC-STEJIC, M., AGIUS, E., BOOTH N., DUNNE P. J., LACY K. E., REED J. R., SOBANDE, S. K., SALMON, M., RUSTIN, M. H., AND AKBAR A.N. The kinetics of CD4⁺foxp3⁺ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. The journal of clinical investigation, v.118, p. 3639-3650, 2008.



WEIR, R.E., BLACK, G.F., DOCKRELL, H.M., FLOYD, S., FINE, P.E., CHAGULUHA, S.D., STENSON, S., KING, E., NAZARETH, B., WARDORFF, D.K., NGWIRA, B., CRAMPIN, A.C., MWAUNGULU, L., SICHALI, L., JARMAN, E., DONOVAN, L. & BLACKWELL, J.M. Mycobacterial purified protein derivatives stimulate innate immunity: Malawians show enhanced tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 β (IL- β), and IL-10 responses compared to those of adolescents in the United Kingdom. Infection and Immunity, v. 72, p.1807-11, 2004.



ARTIGO 2



ARTIGO ORIGINAL

REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULINICO EM PACIENTES IDOSOS – CONTRIBUIÇÃO PARA A REVISÃO DO CRITÉRIO DE POSITIVIDADE

BRITO, CMG¹; BRAGA MC² ; MACHADO, F³ ; DIAS, KC²; ALBUQUERQUE, MFPM^{1,3} CAMPELO ARL¹

1 DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA/ CCS/UFPE

2 LABORATÓRIO DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS/ DEPTO DE PARASITOLOGIA/CPQAM/ FIOCRUZ

3 DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA/CPqAM/FIOCRUZ

Correspondência: Cintia Michele Gondim de Brito Lima
Estrada do Arraial, 2385, apt 1701-Tamarineira-52051360-Recife-Pernambuco
Fone: (81) 88273280- E-mail: cintiabri@yahoo.com.br



RESUMO

**TUBERCULOSE NO IDOSO: REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E NÍVEIS DE CÉLULAS T
REGULATÓRIAS**



Trata-se de um estudo tipo série de casos cujo objetivo foi descrever o padrão de reatividade ao Teste Tuberculínico (TT) e características dos indivíduos idosos com e sem tuberculose (TB) doença e adultos com TB, assim como identificar o ponto de corte da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) que melhor discrimina idosos com e sem TB doença. Estudou-se um grupo de idosos (≥ 60 anos) com TB, adultos (20-49) com TB doença e idosos (≥ 60 anos) sem TB doença. Os participantes foram recrutados nos serviços da rede pública de saúde que prestam assistência a pacientes com TB na cidade do Recife (PE), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. Os pacientes idosos com TB foram predominantemente do sexo masculino (67,7%) e a média de idade foi 68,3 anos. Observou-se desnutrição nos idosos (41,9%) e adultos (34,5%) com TB e maiores percentuais de sobrepeso (48,1%) e obesidade (33,4%) nos idosos sem TB. Com relação aos hábitos de vida, a maioria dos etilistas (54,8%) e tabagistas (58,1%) encontrava-se no grupo de idosos doentes. A forma pulmonar predominou tanto nos grupos de idosos quanto nos adultos com TB, 29 (93,5%) e 23 (79,3%) respectivamente. Ao comparar a média em milímetros do valor do TT dos três grupos, verificou-se $3,19 \pm 4,35$ para os idosos sem TB doença; $7,52 \pm 7,83$ para os idosos com tuberculose e $10,76 \pm 5,69$ para os adultos com tuberculose e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$). A curva ROC identificou o ponto de corte de 5 mm como aquele que apresenta os valores de sensibilidade (0,61) e especificidade (0,78) mais elevados para discriminar os idosos com tuberculose doença dos idosos sem TB doença. Com base nos resultados encontrados, sugere-se que o critério de positividade do TT nos indivíduos idosos seja revisto.

Palavras-chaves: Tuberculose; Idoso; Teste Tuberculínico; Curva ROC.



ABSTRACT



This is a series of cases study aimed to describe the pattern of reactivity to the tuberculin test (TT) and characteristics of elderly individuals with and without tuberculosis (TB) disease and adults with TB, and identify the cut-off point ROC (Receiver Operating Characteristic) that best discriminates elderly with and without TB disease. We studied a group of elderly (≥ 60 years) with TB, adults (20-49) with TB disease and elderly (≥ 60 years) without TB disease. Participants were recruited from the public health network providing assistance to TB patients in Recife (PE), from January 2008 to December 2009. Elderly patients with TB were predominantly male (67.7%) and mean age was 68.3 years. Observed malnutrition in the elderly (41.9%) and adults (34.5%) with TB, and higher rates of overweight (48.1%) and obesity (33.4%) in elderly patients without TB. With respect to lifestyle, most alcoholics (54.8%) and smokers (58.1%) were in the group of elderly patients. The pulmonary form predominated in both groups of elderly patients as in adults with TB, 29 (93.5%) and 23 (79.3%) respectively. When comparing the mean value in millimeters of the TT of the three groups, 3.19 ± 4.35 for the elderly without TB disease, 7.52 ± 7.83 there was for older people with tuberculosis and 10.76 ± 5.69 for adults with tuberculosis and this difference was statistically significant ($p = 0.001$). The ROC curve identified a cutoff of 5 mm as the one that shows the values of sensitivity (0.61) and specificity (0.78) higher for discriminating against elderly patients with TB disease of the elderly without TB disease. Based on these results, we suggest that the criterion for positivity of TT in the elderly needs to be reviewed.

Keywords: Tuberculosis; Elderly; Tuberculin Test; ROC curve.



1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) humana possui como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), um bacilo aeróbio intracelular de multiplicação lenta (Van Crevel, 2002). Indivíduos com TB latente representam importante reservatório de *M. tuberculosis*, embora os microrganismos, nesta fase de infecção, se mostrem metabolicamente inativos, condição que está associada à ausência de manifestações clínicas (North et al, 2004; Kaufmann, 2005).

Estima-se que um terço da população mundial alberga a micobactéria sem manifestar sintomas da doença, podendo progredir para doença ativa (Rosemberg, 2001). O risco de adoecimento entre os portadores de Infecção Latente Tuberculose (ILTb) na população em geral é em média 0,2% no mundo ao ano, ocorrendo por reativação endógena (Orme, 2001).

A história natural da tuberculose mostra que a maioria dos indivíduos é resistente ao adoecimento, provavelmente devido à capacidade de gerarem uma eficiente resposta contra a *M. tuberculosis*, porém das pessoas expostas ao bacilo entre 10-30% ao longo da vida se tornam infectadas e a infecção progride transformando-se em TB ativa. Entre estes, os idosos representam um grupo bastante vulnerável a desenvolver a doença, devido à depressão das defesas orgânicas na idade avançada e condições imunossupressoras associadas (Vendramini, 2003; Texeira, 2007).

O fato dos idosos terem vivido, teoricamente, em décadas em que as taxas de transmissão de TB eram mais altas, aumenta o risco desses desenvolverem a doença, já que a maioria dos idosos desenvolve TB doença por reativação de foco latente de cepas adquiridas na infância (Bierrenbach, 2007).

A tuberculose no idoso é um problema de saúde emergente e complexo, devido às características inerentes à doença e presença de fatores que favorecem a sua gravidade neste grupo etário (Freitas, 2002).

A realização da prova tuberculínica pode auxiliar no conhecimento do grau de susceptibilidade da população à infecção pelo *M. tuberculosis* (Maciel, 1999; Silva Jr, 2004; Pai et al., 2005). Porém, Algumas circunstâncias podem interferir no resultado da prova tuberculínica levando a resultados negativos, como as doenças imunossupressoras (sarcoidose, síndrome da imunodeficiência adquirida, neoplasias), tratamentos com corticosteróides, uso de drogas imunossupressoras e idade avançada (Silva Jr, 2004).

O objetivo deste trabalho foi descrever o padrão de reatividade ao Teste Tuberculínico e características dos indivíduos idosos com e sem TB doença e adultos com TB, assim como identificar o ponto de corte da curva ROC que melhor discrimina idosos com e sem TB doença.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho e população de estudo:

Estudou-se uma série de casos de idosos com TB comparando-os com adultos com TB doença e idosos sem TB doença. Construiu-se uma curva ROC para identificação do melhor porte de corte do resultado do TT que discriminou idosos com e sem TB doença na população de estudo. Os participantes foram recrutados através de busca ativa nos serviços da rede pública de saúde que prestam assistência a pacientes com TB na cidade do Recife (PE), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009.

Utilizou-se uma amostra de conveniência de 31 indivíduos idosos (idade ≥ 60 anos) e 29 adultos jovens (20 a 49 anos) com diagnóstico clínico e bacteriológico de tuberculose confirmado há menos de 15 dias e 27 idosos (≥ 60 anos de idade), sem TB doença e sem lesão pulmonar à radiografia de tórax.

Foram excluídos os pacientes portadores de câncer, diabetes ou HIV positivos e em tratamentos quimioterápico ou corticoterapia.

2.2. Coleta dos dados:

Os participantes foram recrutados nas unidades de saúde, e a coleta dos dados foi realizada de acordo com as seguintes etapas: (1) obtenção de dados sócio-demográficos e clínicos a partir de entrevista realizada por técnicos treinados, utilizando questionário padronizado, e consulta aos prontuários; (2) Coleta do escarro para realização da baciloscopia e/ou cultura; (3) coleta de 30 ml de sangue venoso para a realização de testes sorológicos (anti-HIV), bioquímicos (glicemia de jejum), hematológicos (hemograma), (4) aplicação e leitura do TT.

As amostras de sangue foram processadas no laboratório Municipal de Saúde Pública da Cidade do Recife (PE).

2.3. Variáveis do Estudo:

2.3.1. Variável dependente:

Resposta ao teste tuberculínico realizado pela técnica de Mantoux (1908), mensurada em milímetros e agrupados em: não reator (0-4 mm), reator fraco (5-9 mm) e reator forte (≥ 10 mm) (Brasil, 2002).

Para construção da curva ROC o resultado do TT foi utilizado como variável contínua identificando o ponto de corte que melhor maximiza os valores de sensibilidade e especificidade para discriminar os idosos com tuberculose doença dos idosos sem TB doença.



2.3.2. Variáveis independentes:

Idade, sexo, hábitos de vida (etilismo e tabagismo), Índice de Massa Corpórea (nutrido= $IMC \geq 18,5$; desnutrido= $IMC < 18,50$), Forma clínica da TB (pulmonar ou extra-pulmonar).

2.4. Considerações éticas:

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Todos os voluntários que participaram leram, assinaram e receberam uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), antes da realização de qualquer procedimento do estudo.

2.5. Análises Estatísticas:

Os questionários foram codificados e digitados pela autora. Usou-se o aplicativo EPI INFO versão 3.5.1 para o armazenamento dos dados e o software SPSS versão 8 para a análise.

As diferenças entre as médias do TT nos diferentes grupos do estudo foram testadas por meio da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre proporções testadas pelo cálculo de qui-quadrado. Todas as decisões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

Realizou-se ainda, um procedimento estatístico Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para identificar o ponto de corte com melhor acurácia para discriminar os idosos com tuberculose doença.



3. RESULTADOS:

3.1. Características da população de estudo:

Dos 98 pacientes que participaram do estudo 11 foram excluídos: quatro porque participaram do piloto da pesquisa; um idoso com TB porque era diabético, quatro idosos sem TB doença, porém, com laudo médico radiológico com lesões pulmonares e dois adultos doentes com sorologia positiva para HIV. A população de estudo resultou, portanto, em 87 pacientes que foram agrupados de acordo com seu diagnóstico clínico: 27 idosos sem TB doença; 31 idosos e 29 adultos, ambos com TB doença. As características principais dos grupos estudados encontram-se sumarizados na tabela 1.

Pode-se observar que no grupo de idosos com TB a idade média dos pacientes foi 68,3 anos, e predominou o sexo masculino (67,7%). Em relação ao estado nutricional, mensurado pelo índice de massa corpórea (IMC), observou-se um maior percentual de desnutrição (IMC <18,5) entre os idosos (41,9%) e adultos (34,5%) com tuberculose, enquanto nenhum idoso sabidamente não doente apresentou-se desnutrido. Ao contrário, observou-se que os maiores percentuais de sobrepeso (48,1%) e obesidade (33,4%) foram encontrados nesse grupo. Quanto aos hábitos de vida estudados, observou-se que a maioria dos etilistas (54,8%) e tabagistas (58,1%) encontrava-se no grupo de idosos doentes. A forma clínica pulmonar da tuberculose foi mais freqüente tanto nos idosos (93,5%) quanto nos adultos (79,3%). A tuberculose extrapulmonar nos idosos foi uma tegumentar e uma intestinal. Nos adultos, as manifestações extrapulmonares foram: três pleural, duas ganglionar e uma ocular.



Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo (N=87) segundo aspectos biológicos e de hábitos de vida, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

	Diagnóstico Clínico		
	Idoso sem TB (n=27)	Idoso com TB (n=31)	Adulto com TB (n=29)
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
Idade (anos)	69,3 (7,2)	68,3 (8,4)	31,3 (8,6)
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Sexo</i>			
Feminino	17 (62,9)	10 (32,3)	15 (51,7)
Masculino	10 (37,1)	21 (67,7)	14 (48,3)
<i>IMC</i>			
Desnutrido	0 (0,0)	13 (41,9)	10 (34,5)
Peso adequado	5 (18,5)	9 (29,1)	8 (27,6)
Sobrepeso	13 (48,1)	3 (9,7)	5 (17,2)
Obeso	9 (33,4)	6 (19,3)	6 (20,7)
<i>Etilista</i>			
Não	14 (51,8)	14 (45,2)	15 (51,7)
Sim	13 (48,2)	17 (54,8)	14 (48,3)
<i>Fumante</i>			
Não	17 (62,9)	13 (41,9)	14 (48,3)
Sim	10 (37,1)	18 (58,1)	15 (51,7)
<i>Forma clínica</i>			
Pulmonar	-	29 (93, 5)	23 (79,3)
Extrapulmonar	-	2 (6,5)	6 (20,7)

*IMC= Índice de Massa Corpórea TB= Paciente com Tuberculose DP= Desvio Padrão

3.2. Reatividade ao teste tuberculínico:

A tabela 2 mostra a distribuição da reatividade ao TT por categoria segundo grupos. No grupo de idosos doentes verificaram-se percentuais de 41,9%, 19,4% e 38,7% de não reatores, reatores fracos e reatores fortes, respectivamente. No grupo de idosos sem TB doença 77,8% foram não reatores, 7,4% foram reatores fracos e 14,8% reatores fortes. E os adultos com TB 13,8%, 24,1% e 62,1%. A diferença de distribuição do resultado do TT por categoria entre os três grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,001$).



Ao comparar a média em milímetros do valor do TT dos três grupos, verificou-se $3,19 \pm 4,35$ para os idosos sem TB doença; $7,52 \pm 7,83$ para os idosos com TB e $10,76 \pm 5,69$ para os adultos com TB e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$) (tabela 2).

Tabela 2. Padrão de reatividade ao TT dos 87 pacientes por diagnóstico clínico, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

	Diagnóstico Clínico					
	Idoso sem TB (n=27)		Idoso com TB (n=31)		Adulto com TB (n=29)	
	N	%	N	%	N	%
TT por categoria ¹						
0 - 4 mm(Não-reator)	21	77,8	13	41,9	4	13,8
5 - 9 mm(Reator fraco)	2	7,4	6	19,4	7	24,1
≥ 10 mm (Reator forte)	4	14,8	12	38,7	18	62,1
	Média (DP)		Média (DP)		Média (DP)	
Diâmetro TT ² (mm)	$3,19 \pm 4,35$		$7,52 \pm 7,83$		$10,76 \pm 5,69$	

1- Distribuição de TT por categoria estatisticamente diferente entre os grupos de diagnóstico (p valor = 0,001)

2- Diâmetro TT estatisticamente diferente entre os grupos de diagnóstico (p valor = 0,001)

3.3. Curva ROC:

Para a construção da curva ROC (figura 1) foram incluídos 31 pacientes idosos com tuberculose doença e 27 idosos sem tuberculose doença. A curva identificou o ponto de corte de 5 (cinco) mm como aquele que apresenta os valores de sensibilidade (0,61) e especificidade (0,78) mais elevados para discriminar os idosos com tuberculose doença dos idosos sem TB doença.

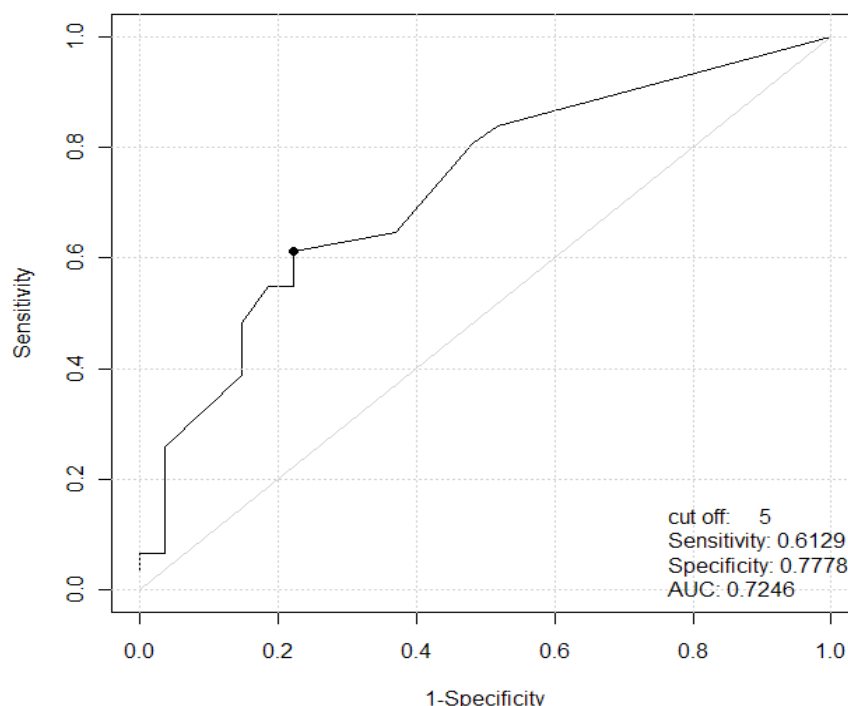


Figura 1. Curva ROC exibindo o ponto de corte que maximiza a Sensibilidade e a Especificidade do TT para discriminar idosos com e sem tuberculose doença atendidos em serviços de saúde no Recife (PE) no período de janeiro/2008 a dezembro/2009

4. DISCUSSÃO

Visando avaliar o grau de sensibilidade do TT utilizado pela rede do Sistema Único de Saúde de atendimento em pacientes suspeitos de TB, o presente estudo investigou três populações diferentes de pacientes submetidos ao referido teste.

A tuberculose em idosos é um problema de saúde pública de razoável magnitude no Brasil. Estudos realizados em diferentes localidades geográficas do país (Vendramini et al 2003, Cavalcanti et al 2006, Domingos, 2007), apontaram para um crescente risco de morte por TB entre idosos, atribuindo-se ao fato da sua apresentação clínica frequentemente atípica e presença de co-morbidades associadas. No presente estudo, a idade dos idosos com TB variou de 60 a 99 anos com média de 68 anos.

A casuística estudada teve um predomínio do sexo masculino entre os idosos com TB. Esses dados estão de acordo com a literatura, que demonstram que TB acomete mais o sexo masculino (Vendramini, 2003; Cavalcanti, 2006) uma vez que



pacientes do sexo feminino parecem ter um maior cuidado com a saúde e procuram com mais frequência os serviços de saúde (Coberly et al, 2001).

Os resultados encontrados no nosso trabalho mostram que entre os desnutridos estavam os idosos e adultos com TB doença e contrariamente, o grupo de idosos sem TB apresentou os maiores percentuais de sobrepeso e obesidade. Segundo Cervi (2005) o interesse na nutrição de idosos tornou-se maior nos últimos anos devido ao grande aumento de enfermidades associadas. No seu estudo observou-se que os idosos com tuberculose possuem baixo índice de massa corpórea. Estudos demonstram que a desnutrição protéico-calórica em idosos com TB, tem papel na susceptibilidade imunológica à tuberculose (Cantalice filho, 2007).

Nesta pesquisa, a história de alcoolismo e tabagismo esteve presente e a maioria encontrava-se no grupo de idosos doentes. A relação álcool e tuberculose doença já são conhecidas e abordadas por vários autores (Nogueira, 2001; Albuquerque et al, 2001). Em um estudo recente realizado por Cantalice Filho (2007), que analisou o tratamento da tuberculose pulmonar em idosos de um hospital universitário do Rio de Janeiro, foi demonstrado que tanto o etilismo como o tabagismo mantêm relação positiva com a população idosa. O fumo pode também ter uma atuação na tuberculose através de mecanismos imunológicos que promovem uma diminuição dos níveis locais de TNF- α deixando o paciente mais susceptível ao desenvolvimento progressivo da doença a partir da TB latente (Davies, 2006).

Em relação às formas clínicas da doença, dos idosos com tuberculose que participaram do estudo 2 apresentaram a forma clínica extrapulmonar: tegumentar e intestinal. O que é reforçado por Lopes (2006) quando afirma que a lesão cutânea, na grande maioria dos casos, é uma manifestação secundária da doença e são muitas as formas de apresentação cutânea da tuberculose, que dependem, sobretudo, do estado imunológico do paciente.

Pode-se observar ainda, que dos pacientes adultos doentes que participaram deste estudo 6 tiveram a forma clínica extrapulmonar: 3 do tipo pleural, 2 ganglionar e 1 ocular. De acordo com Seiscento (2006) e Lopes (2006) a tuberculose pleural é a forma extrapulmonar mais comum de tuberculose no adulto imunocompetente. Outra forma extrapulmonar também muito freqüente no grupo de adultos e crianças (Carreira, 2000) é a ganglionar, que no grupo de adulto habitualmente, o teste tuberculínico é forte reator, exceto em indivíduos imunossuprimidos. Já à forma clínica ocular, em razão da condição do aparelho visual limitar o estudo histológico, o diagnóstico da tuberculose ocular é sustentado por dados epidemiológicos, teste tuberculínico positivo e exclusão laboratorial de outras afecções, principalmente a toxoplasmose (Lopes, 2006).

A curva ROC é uma ferramenta poderosa para mensurar o desempenho de testes diagnósticos em saúde. Esta análise por meio de um método gráfico simples e robusto permitiu estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte para o TT em idosos com TB (BRAGA, 2000). No presente estudo foram analisados vários pontos de corte e identificado o ponto de corte de 5 mm como aquele



que melhor maximiza os valores de sensibilidade e especificidade para discriminar os idosos com tuberculose doença dos idosos sem TB doença.

A princípio foi estabelecido uma curva ROC para delimitar o melhor ponto de corte para a análise do diâmetro do TT para a população idosa. Os resultados demonstram que a maioria dos idosos sem TB doença apresentou resultado não-reator ao TT enquanto os grupos de idosos e adultos com TB apresentaram não-reatores ao teste. Entretanto, 41,9% dos idosos com TB apresentaram não reatores ao TT, o que denota preocupação quanto a real eficácia do mesmo.

Alguns estudos têm demonstrado que o valor da reatividade ao TT em idosos pode mostrar-se diminuído (Harada et al, 1989) ou até mesmo desaparecer com o avançar da idade (Chaimowicz, 2010). Possivelmente, esse fato pode ser atribuído a diminuição da hipersensibilidade no idoso, uma vez que estudos afirmam que uma diminuição da responsividade de células mononucleares periféricas acarreta prejuízo para hipersensibilidade cutânea (Corriga et al; 1999; Panayi; et al 2001).

A curva ROC identificou o ponto de corte de 5 mm como aquele que maximiza os valores de sensibilidade e especificidade para discriminar os idosos com tuberculose doença dos idosos sem TB doença. Esse resultado sugere que na população idosa a reatividade ao TT precisa ser revisto. O critério de positividade deveria estar baseado nas evidências de imunodepressão decorrente do processo de envelhecimento (CHAIMOWICZ, 2010). O ponto de corte de 5mm poderia apontar a necessidade de investigar a TB em atividade.

Em pacientes com imunodepressão secundária à infecção pelo HIV o teste tuberculínico com induração maior ou igual a 5 mm é considerado reator forte (SOUZA, 2006). Fato enfatizado no Guia de Vigilância epidemiológica (2009) que afirma que pacientes HIV/AIDS com TT maior ou igual a 5 mm é indicado para o tratamento para ITBL como alto risco de adoecimento.

A preocupação com relação ao ponto de corte do TT já está expressa no Guia de Vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde (2009). A antiga classificação para valores de TT de 0 a 4 mm- Não reator; 5 a 9 mm- Reator fraco e 10mm ou mais- Reator forte, deixa de existir e só será levado em consideração os pontos de corte 5 ou 10 mm dependendo do caso. As Indicações de Tratamento para ILTB vai depender de três fatores: Idade; Risco de adoecimento e Resultado do TT. Entretanto neste manual o Ministério da Saúde não estabeleceu um ponto de corte específico para idosos acima de 60 anos, definição adotada pela Organização das Nações Unidas para idosos que vivem em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil.

Os idosos de hoje são sobreviventes de coortes iniciadas na década de 40, tendo sido expostos à TB durante a infância, quando a prevalência da doença era alta e os esquemas terapêuticos menos eficazes. Por este motivo estima-se que 20% a 50% dos idosos tenham TB infecção (Chaimowicz, 2001). Esta população, albergando o bacilo de Koch e com as deficiências próprias do envelhecimento, pode vir a desenvolver a



doença. Nos países desenvolvidos, aproximadamente 90% dos casos de TB doença em idosos são secundários à reativação de foco latente (Rosemberg, 2001).

Enquanto diagnosticar e tratar Infecção Latente Tuberculose (ILTb) em países desenvolvidos é um componente essencial do controle da TB, esta é uma estratégia que não tem tido a devida importância em países em desenvolvimento. Nestes países, devido ao elevado risco de infecção pela alta incidência, a prioridade do sistema é o tratamento dos casos ativos. Deste modo, a utilização de testes para diagnóstico da infecção TB nestes locais é restrita a situações que incluem: vigilância epidemiológica, crianças, pacientes desnutridos com tuberculose e infecção tuberculosa em pacientes com HIV (Dhedha et al., 2005).

Ao longo deste estudo procurou-se demonstrar que os idosos devem ser vistos como um grupo de grande vulnerabilidade para a tuberculose pelo Programa de Controle da Tuberculose. As atividades de controle da endemia desenvolvidas no município do Recife, não têm considerado este grupo de indivíduos para a prevenção da doença, principalmente, levando-se em consideração a transição epidemiológica, o risco de ativação da tuberculose endógena e os fatores biológicos e hábitos de vida. Diante disso, recomenda-se uma maior atenção à questão do teste tuberculínico na prevenção da tuberculose em idosos, uma vez que esta ação pode contribuir para o controle da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação Estadual do Programa de Controle da Tuberculose de Pernambuco, pela disponibilidade em fornecer algumas informações importantes; aos profissionais de saúde da rede do Sistema Único de Saúde do município de Recife, pela cooperação na coleta dos dados; à Biblioteca Central da Universidade Federal de Pernambuco, pela ajuda na revisão bibliográfica; Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães por toda estrutura laboratorial e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio e financiamento da pesquisa.



REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE MFM, LEITÃO CCS, CAMPELO ARL, SOUZA WVS, SALUSTIANO A. Fatores prognósticos para o desfecho do tratamento da tuberculose pulmonar em Recife, Pernambuco, Brasil. Rev. Panam. Salud. Publica/Pan Am J Public Health, v. 9, n. 6, p. 368-74, 2001.

BIERRENBACH, Ana Luiza; DUARTE, Elisabeth Carmen; GOMES, Adriana Bacelar Ferreira and SOUZA, Maria de Fátima Marinho de. Tendência da mortalidade por tuberculose no Brasil, 1980 a 2004. Rev. Saúde Pública, vol.41, sup.1, pp. 15-23, 2007.

BRAGA, ACS. Curvas ROC: Aspectos funcionais e aplicações. Tese (Doutorado em engenharia de produção e sistemas, áreas de métodos numéricos e estatísticos). Universidade do Minho, Portugal, 2000. 267 p.

CANTALICE FILHO, João Paulo; BOIA, Márcio Neves and SANT`ANNA, Clemax Couto. Análise do tratamento da tuberculose pulmonar em idosos de um hospital universitário do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. J. bras. pneumol., vol.33, n.6, pp. 691-698, 2007.

CAVALCANTI, Z.R; ALBUQUERQUE, M.F.M; CAMPELO, A.N.R; XIMENES, R; MONTARROYOS, U; VERÇOSA; M.K.A. Características da tuberculose em idosos no Recife (PE): contribuição para o programa de controle. J Bras Pneumol., v. 32, n. 6, p. 535-43, 2006.

CERVI, Adriane; FRANCESCHINI, Sylvia do Carmo Castro and PRIORE, Sílvia Eloiza. Análise crítica do uso do índice de massa corporal para idosos. Rev. Nutr. , vol.18, n.6, pp. 765-775, 2005.

CHAIMOWICZ, Flávio. Transição etária da incidência e mortalidade por tuberculose no Brasil. Rev. Saúde Pública, v. 35, n. 1, 2001.

CHAIMOWICZ, F. Pulmonary tuberculosis in older people. Part II: Clinical presentation and diagnosis. p. 245- 251, 2010. Disponível em http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=1785. Acessado em 24 de maio de 2010.

COBERLY JS, CHAISSON RE. TUBERCULOSIS. IN: NELSON KE, WILLIAMS CM, GRAHAM NMH, eds. Infectious disease epidemiology theory and practice. Maryland: Aspen Publishers, Inc; 411-437, 2001.



CORRIGALL, V.M.; GARYFALLOS, G.; PANAYI, G.S. The relative proportions of secreted interleukin-2 and interleukin-10 determine the magnitude of rheumatoid arthritis Tcell proliferation to the recall antigen tuberculin purified protein derivative. Rheumatology, v. 38, p. 1203-1207, 1999.

DAVIES, P.D.O; YEW, W.W; GANGULY, D; DAVI DOW, AL; ET AL. Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and immunopathogenesis. Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg. v. 100, p. 291-298, 2006.

DHEDA, K. et al. Utility of the antigen-specific interferon-γ assay for the management of tuberculosis. Current Opinion in Pulmonary Medicine, v. 11, p. 195-202, 2005.

DOMINGOS, M.P. Tuberculose em Recife, PE- O efeito da estratégia DOTs (Directly Observed Treatment Short- course) e fatores associados ao óbito e ao abandono de tratamento, 1996 a 2005. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FREITAS, E. V; PY,L; NERY, A L; CANÇADO, FAX; GORZONE, ML; ROCHA, SM. Tratado de Geriatria e Gerontologia. p.362-73. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2002.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Tuberculose CID 10: A15 a A19. 7ª edição. P.39-60, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_tuberculose.pdf, Acesso: 27.MAI.2010.

HARADA, S; TAKAMOTO, M; HARADA, Y; NINOMIYA, H; MARUYAMA, M; ISHIBASHI, T; SHINODA, A. Clinico-immunological studies of pulmonary tuberculosis in the elderly. Kekkaku v. 64, n.8, p. 529-36, 1989.

LOPES, AJ et al. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. Rev. Pulmão-RJ; 15(4): p.253-261. 2006. Disponível em: <http://www.sopterj.com.br/dominios/sopterj/tuberculose/curso/5.pdf>. Acessado em 23 de maio de 2010.

MACIEL ELN. Infecção por Mycobacterium tuberculosis em estudantes de enfermagem: um estudo de incidência através do Teste PPD / The incidence of infection by Mycobacterium tuberculosis in nursing students. Rio de Janeiro; s.n; jan. Rev Soc Bras Med Trop. p.79, 1999.



MANTOUX, C. Intradermo-réaction de la tuberculine. Comptes rendus de l'Académie des sciences, Paris, 1908, 147: 355-57 apud. Disponível em: <http://www.whonamedit.com/synd.cfm/2767.html>. Acesso: 01 nov. 2005.

NOGUEIRA PA. Motivos e tempo de internação e o tipo de saída em hospitais de tuberculose do Estado de São Paulo, Brasil – 1981 a 1995. J Pneumol, v. 27, n. 3, 2001.

NORTH, R.J. & JUNG, Y.J. Immunity to tuberculosis. Annual Review of Immunology, v. 22, p. 599-623. 2004.

PAI, M et al. Mycobacterium tuberculosis Infection in Health Care Workers in Rural India: Comparison of a Whole-Blood Interferon [gamma] Assay with Tuberculin Skin Testing. JAMA, v. 293, p. 2746-2755, 2005.

PANAYI, G.; CORRIGAL, V.; PITZALIS, C. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of cells and others beasts. Rheumatic Diseases Clinics of North America, v. 161, p. 221-247, 2001.

ROSEMBERG, José. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. Bol. Pneumol. Sanit. [online]. vol.9, no.1, p.35-59, 2001. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103>, acesso em junho 2010.

SEISCENTO, Márcia; CONDE, Marcus Barreto and DALCOLMO, Margareth Maria Pretti. Tuberculose pleural. J. bras. pneumol., vol.32, suppl.4, pp. S174-S181, 2006.

SILVA JR, J.B. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Jornal Brasileiro de Pneumologia, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180637132004000700003&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 22 nov. 2009.

SOUZA, Lenice do Rosário de et al. Teste tuberculínico em indivíduos com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana: relação com número de linfócitos T periféricos e atividade tuberculosa. J. bras. pneumol. vol.32, n.5, pp. 438-443, 2006.

SVS/ MS. PESQUISAS E ESTATÍSTICAS/Conceitos Estatísticos/Sensibilidade e Especificidade. Disponível em: http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/conteudo/index.php?id_conteudo=11450&rastr=PESQUISAS+E+ESTAT%C3%8DSTICAS%2FConceitos+Estat%C3%ADsticos/Sensibilidade+e+Especificidade. Acesso em: 21. AGOS. 2010.

TEIXEIRA, H. C., ABRAMO, C., MUNK, M. E., Diagnóstico Imunológico Da Tuberculose:Problemas E Estratégias Para O Sucesso. J bra pneumol., p. 323-334. 2007.



VAN CREVEL, R; OTTENHOFF, T.H.; VAN DER MEER, J.W. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. Clinical Microbiology Review, v. 152, p. 294-309, 2002.

VENDRAMINI SHF, Villa TCS, Cardozo Gonzales RI, Monroe A Tuberculose no idoso: análise do conceito. Rev Latino-am Enfermagem, v.11, n.1, p. 96-103, 2003.



ARTIGO 3



ARTIGO ORIGINAL

NÍVEIS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ E SUA CORRELAÇÃO COM A REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO EM IDOSOS COM TUBERCULOSE

BRITO, CMG¹; BRAGA MC³ ; MACHADO, F⁴ ; CASTANHA, PMS³; PEREIRA, VRA²; ALBUQUERQUE, MFPM^{1,4}

1 DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA/ CCS/UFPE

2LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA/DEPTO DE IMUNOLOGIA/CPQAM/ FIOCRUZ

3 LABORATÓRIO DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS/ DEPTO DE PARASITOLOGIA/CPQAM/ FIOCRUZ

4 DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA/CPqAM/FIOCRUZ

Correspondência: Cintia Michele Gondim de Brito Lima
Estrada do Arraial, 2385, apt 1701-Tamarineira-52051360-Recife-Pernambuco
Fone: (81) 88273280- E-mail: cintiabri@yahoo.com.br



RESUMO



Este trabalho teve como objetivo verificar a correlação entre os níveis de células T regulatórias $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ e a reatividade ao Teste Tuberculínico (TT) em idosos e adultos com tuberculose (TB) em atividade e idosos sem TB. Os participantes da pesquisa foram recrutados nos serviços da rede pública de saúde que prestam assistência a pacientes com TB na cidade do Recife (PE), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. A expressão de $FOXP3^+$ por PCR em tempo real foi realizada em 61 pacientes, enquanto que quantificação das células Treg por citometria de fluxo em 25. Compararam-se os resultados entre os grupos utilizando-se médias e percentuais do número de células Treg/ μ l com diferentes níveis de reatividade do TT pela correlação de Pearson. A diferença entre as médias nos diferentes grupos do estudo foi testada por meio da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre proporções testadas pelo cálculo de qui-quadrado. Todas as decisões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os percentuais médios de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ foram menores na população de idosos com TB ($23,16 \pm 13,73$) quando comparado com as médias dos grupos de idosos sem doença ($28,70 \pm 27,11$) e adultos doentes ($34,16 \pm 26,02$), porém sem diferença estatística. Os idosos doentes apresentaram menor expressão do gene $FOXP3^+$ ($17,4 \pm 1,27$) em relação aos idosos sem TB doença ($18,0 \pm 0,99$) e adultos com TB ($18,5 \pm 2,15$), também sem diferença estatística. Ao analisar a correlação entre o resultado do TT em milímetros e o percentual no sangue periférico de $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ em 25 pacientes observou-se que só houve correlação estatisticamente significativa, entre as duas variáveis, no grupo de adultos com TB doença ($p=0,004$). No entanto, verificou-se uma correlação positiva entre a resposta do TT em mm e os níveis de $FOXP3^+$ nos grupos de adultos ($p=0,025$) e idosos com TB em atividade ($p=0,034$) e uma correlação negativa entre a resposta do TT e os níveis de $FOXP3^+$ no grupo de idosos sem TB. Os resultados encontrados indicam uma diminuição dos níveis de células T regulatórias na circulação periférica de pacientes idosos com tuberculose em atividade, sugerindo existir uma imunodepressão nesse grupo que pode ser responsável pela menor reatividade ao TT quando comparado aos adultos com tuberculose.

Palavras-chaves: Tuberculose; Idoso; Imunidade; células T regulatórias $CD4^+CD25^+FOXP3^+$; Teste Tuberculínico.



ABSTRACT



This study aimed to investigate the correlation between levels of regulatory T cells CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ and the reactivity to the tuberculin test (TT) in elderly and adults with active tuberculosis (TB) and elderly patients without TB. Survey participants were recruited from the public health network providing assistance to TB patients in Recife (PE), from January 2008 to December 2009. The expression of FOXP3⁺ by real time PCR was performed in 61 patients, whereas quantification of Treg cells by flow cytometry at 25. We compare the results between groups using means and percentages of the number of cells Treg/ μ l with different levels of reactivity of the TT by Pearson correlation. The difference between the averages in the different study groups was tested by analysis of variance (ANOVA) and differences in proportions tested by calculating chi-square. All decisions were taken at a significance level of 5%. The average percentages of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ were lower in elderly patients with TB (23.16 ± 13.73) compared with the averages of groups of subjects without disease (28.70 ± 27.11) and adult patients (34.16 ± 26.02), but without statistical difference. The elderly patients had lower expression of the FOXP3⁺ gene (17.4 ± 1.27) compared with subjects without TB (18.0 ± 0.99) and adults with TB (18.5 ± 2.15), also without statistical difference. By analyzing the correlation between the result of TT in millimeters and percentage in peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ in 25 patients showed that there was only statistically significant correlation between the two variables in the group of adults with TB disease ($p = 0.004$). However, there was a positive correlation between the TT response in mm and the levels of FOXP3⁺ in groups of adults ($p = 0.025$) and older people with active TB ($p = 0.034$) and a negative correlation between the TT response and the levels of FOXP3⁺ in the elderly group without TB. The results indicate a decrease in levels of regulatory T cells in peripheral blood of elderly patients with active tuberculosis, there is suggesting that immunosuppression in this group may be responsible for low reactivity to TT when compared with adults with tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis; Elderly; immunity, regulatory T cells CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺; TuberculinTest.



1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em todo mundo, com 8 a 10 milhões de casos novos e 2 a 3 milhões de morte ao ano (Dye et al, 2005). Nos idosos, a redução dos mecanismos de defesa, como barreiras físicas, anergia ou pela ação de células reguladoras (Rajagopalan et al, 2001; Chaimowicz, 2002), associado ao comprometimento da função e produção de linfócitos T contribuem para aumentar a vulnerabilidade do grupo à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Chaimowicz, 2001; Rosemberg, 2001; Teixeira, 2007).

As células T regulatórias (Tregs) representam cerca de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas, sendo usualmente caracterizadas por alta expressão do marcador CD25, embora expressem diversos outros marcadores imunológicos, alguns deles comuns aos das células T CD4⁺ (Sakaguchi, 2004). Essas células aumentam durante a tuberculose infecção e tem sido funcionalmente caracterizadas por sua habilidade para suprimir a imunidade específica ao *M. tuberculosis*, mediante a inibição da produção de citocinas como IFN- γ e IL-10 (Chen et al, 2007; Guyot-revol et al, 2006; Ribeiro-rodrigues et al, 2006; Chen et al, 2007; Chiacchio et al, 2009).

Na população idosa, evidências apontam para uma redução na atividade de células T efectoras e alterações na população de células T regs mediante o aumento do número dessas células nesse grupo etário (Greeg et al, 2005; Dejacó et al 2006; Lajes et al, 2008; Haynes, 2009). Porém outros autores registram decréscimo no número de células T regs em indivíduos mais velhos (Tsaknaridis et al, 2003; Zhao et al, 2007).

Essas alterações imunológicas, aliadas a fatores associados como comorbidades, hábitos de vida e dificuldade de diagnóstico, tornam esse grupo susceptível a doenças infecciosas (Freitas et al, 2002; Vendraminni et al, 2003). Até o momento, não foram observados dados na literatura sobre o papel das células específicas CD4⁺ CD25⁺ na infecção tuberculosa no idoso.

Algumas circunstâncias podem interferir no resultado da prova tuberculínica levando a resultados negativos, como as doenças imunossupressoras (sarcoidose, síndrome da imunodeficiência adquirida, neoplasias), tratamentos com corticosteróides e drogas imunossupressoras, gravidez, crianças abaixo de dois anos e idosos acima de 60 anos (Silva Jr, 2004), além da infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (De Jong, 2004). As células T regs CD4⁺ CD25⁺ estão presentes na epiderme de humanos (Loser et al, 2007). Isso explicaria o aumento na frequência das células T regs, após estimulação antigênica cutânea localizada, refletindo a proliferação dessas células residentes na pele e que apresentam marcadores fenotípicos e funcionais das células T regs naturais (Clark et al, 2007; Vukmanovic-stejic et al, 2008).

As informações a respeito da relação entre as células T regs e a reação de hipersensibilidade ao Teste Tuberculínico (TT) são limitadas (Guyot-revol et al 2006; Mahan, et al, 2008; Vukmanovic-stejic et al, 2008).



O objetivo deste trabalho foi verificar a correlação entre os níveis de células T regulatórias $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ e a reatividade ao TT em idosos e adultos com TB em atividade e idosos sem TB.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho e população de estudo:

Trata-se de um estudo tipo série de casos de idosos (idade ≥ 60 anos) com TB doença com dois grupos de comparação: adultos (20 a 49 anos) com TB doença e idosos (idade ≥ 60 anos) sem TB doença e sem lesão pulmonar à radiografia de tórax.

Os participantes da pesquisa foram recrutados nos serviços da rede pública de saúde que prestam assistência a pacientes com TB na cidade do Recife (PE), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. Foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico e bacteriológico de tuberculose confirmado há menos de 15 dias. E excluídos os pacientes portadores de câncer, diabetes ou HIV positivos e em tratamentos quimioterápico ou corticoterapia.

2.2. Coleta dos dados:

Os participantes foram recrutados nas unidades de saúde, onde foram coletados: escarro para realização da baciloscopia e/ou cultura; 30 ml de sangue venoso para a realização de testes sorológicos (anti-HIV), testes bioquímicos (glicemia de jejum), hematológicos (hemograma) e aplicação e leitura do TT.

Os testes imunológicos e de biologia molecular foram realizados no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ. Os testes de biologia molecular foram realizados de acordo com a técnica utilizada para mensurar a expressão de $FOXP3^+$, a PCR em tempo real (PCR quantitativa ou qPCR), com transcrição reversa prévia em 61 participantes e a avaliação imunológica pela quantificação das células Treg por citometria de fluxo utilizando os marcadores celulares $CD4^+$, $CD25^+FOXP3^+$ em 25 indivíduos. As descrições das técnicas para realização dos ensaios imunológicos e de biologia molecular estão detalhadamente descritas nos itens abaixo.

2.2.1. Purificação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs):

A coleta de sangue periférico total (20 ml) realizada por flebotomia, e o sangue misturado a 10 U/ml de heparina. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas através da separação por gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham). As PBMCs que não foram utilizadas ficaram congeladas em soro fetal bovino adicionado de 10% dimetilsulfoxide (DMSO). Neste caso, foi coletados apenas 5 ml com citrato de sódio para posterior diagnóstico molecular da tuberculose. Dessa forma, o volume total de sangue coletado de cada paciente foi de 25 ml.



2.2.2. Descrição de Técnica de citometria de fluxo utilizando os marcadores celulares CD4⁺, CD25⁺FOXP3⁺:

Os procedimentos, com exceção da leitura por citômetro, foram conduzidos em laboratórios com nível de segurança 3 (NB3). PBMCs frescas ou congeladas foram lavadas por centrifugação uma vez, em PBS contendo 1% de FCS. A suspensão celular foi ajustada para 10⁶ células por tubo e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, com soro humano AB inativado. Para detecção de células T regulatórias naturais, os receptores de superfície CD4, CD25 foram investigados com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo. As células marcadas por 20 minutos em recipiente com gelo, com uma diluição de no máximo 1:100 (ou quando convenientemente titulado) dos seguintes anticorpos monoclonais: clone SK3 anti-CD4 humano conjugado a aloficocianina (APC) (Cat. Nº: 340443); clone M-A251 anti-CD25 humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Cat. Nº: 555431). Todos os anticorpos foram obtidos da BD-Biosciences Pharmingen (Ambriex). Após lavagem, as células foram fixadas em gelo por 2 horas, com uma solução nova de paraformaldeído a 4%, diluída em tampão PBS Dulbecco's pH 7.5. Esta etapa de fixação se destina a inativar irreversivelmente o bacilo de Koch que porventura esteja presente no material biológico. Após uma breve lavagem com tampão de FACS, as células foram ressuspensas em 400 µl de tampão de FACS e analisadas usando citômetro de fluxo FACS Calibur™ e programa CellQuest™ (Becton Dickinson).

2.2.3. Obtenção de mRNA a partir de PBMC:

Após coleta do sobrenadante de cultura no tempo de 24h de cultivo, o pellet de PBMC restante em cada poço da placa foi removido através de raspagem na presença de 0,5 mL de PBS gelado. Após repetição deste processo, a suspensão celular resultante foi transferida para microtubos de 1,5 mL, identificados por estímulo. Em seguida, procedeu-se à centrifugação dos microtubos a 300 Xg por cinco minutos à 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o pellet de PBMC ressuspensionado em TRIZOL (Invitrogen). Após leve agitação em vórtex, as células foram armazenadas à -80°C até a utilização nos ensaios de extração de RNA.

Neste processo, as células armazenadas foram descongeladas e incubadas até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados a cada microtubo 200 µl de clorofórmio P. A. Após centrifugação a 10000 X g por dez minutos a 4°C, a fase polar (DNA e RNA) foi separada da fase apolar (resíduos celulares, proteínas). O sobrenadante contendo RNA/DNA foi então transferido para novos microtubos, onde foram adicionados 500 µl de isopropanol, que promove a precipitação do RNA. Após leve agitação manual e incubação por dez minutos à T. A., as amostras foram novamente centrifugadas a 10000 X g por dez minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a duas centrifugações a 7500 X g por cinco minutos a 4°C na presença de álcool 75%, para fins de lavagem. O sobrenadante resultante foi então descartado e o pellet de RNA foi submetido à secagem



por cinco minutos. Após esta etapa, foram adicionados aos microtubos 30ul de água livre de RNase. O RNA foi então submetido a quantificação por espectrofotometria e, a partir das concentrações obtidas todas as amostras foram normalizadas para uma única concentração. Em seguida as amostras foram estocadas a -70°C até o momento da utilização em ensaios de transcrição reversa.

2.2.4. Conversão de RNA em cDNA através de transcrição reversa:

Para a transcrição reversa foi utilizado o kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems), segundo protocolo do fabricante. O RNA obtido a partir de PBMC pelo método do TRIZOL foi submetido à conversão em cDNA em um termociclador (Eppendorf mastercycler gradient). Além disso, uma amostra de RNA ribossomal 18S, presente no kit “TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents, VIC Probe” foi submetida ao mesmo processo, a fim de se obter o controle positivo da reação de PCR em tempo real.

A RT-PCR foi realizada em volume final de 50µl, contendo TaqMan RT Buffer 1x, MgCl₂ 5,5mM, Mix de dNTPs 500µM, Hexâmeros randômicos 2,5µM, inibidor de RNase 0,4 U/µL, a enzima multiscrite reverse transcriptase 3,125 U/µL e 12,375µL de amostra. A reação consistiu de um ciclo, sendo este dividido em dez minutos a 25°C , trinta minutos a 48°C e cinco minutos a 95°C . O cDNA obtido foi então submetido a quantificação por espectrofotometria e, a partir das concentrações obtidas, todas as amostras foram normalizadas para uma única concentração. Após esta etapa, as amostras foram armazenadas a -20°C até a utilização nos ensaios de PCR em tempo real.

2.2.5. Avaliação da expressão de mRNA para FOXP3⁺:

A expressão de mRNA para FOXP3⁺ (gene alvo) foi avaliada através da reação de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema de detecção de sequências ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). A reação foi confeccionada em volume final de 25µL, contendo TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), TaqMan Gene Expression Assay para FOXP3⁺ (Assay ID: Hs99999918_m1), constituído de primers e sonda específicos (fluoróforo FAM), água livre de RNase e 1µL de amostra. Em paralelo, como controle endógeno (gene de referência) da reação foi utilizado RNA ribossomal 18S, cuja reação foi preparada com TaqMan Universal PCR Master Mix, primers forward e reverse para RNA ribossomal 18S, sonda para RNA ribossomal 18S (fluoróforo VIC), água livre de RNase e 1µL de amostra. A expressão de mRNA para FOXP3⁺ para cada estímulo foi calculada pelo método do Ct comparativo, sendo os valores obtidos normalizados com o gene de referência (ΔCt). Este cálculo foi feito da seguinte maneira:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{FOXP3}) - \text{Ct}(\text{RNA 18S}),$$

onde Ct corresponde ao ponto no gráfico onde a amplificação se torna exponencial. Após a normalização dos valores do gene alvo, o ΔCt deste foi subtraído do ΔCt de um elemento calibrador ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Este foi escolhido de acordo com a situação a ser

analisada, seja em comparação ao grupo controle ou entre os grupos de pacientes. Foi utilizada a fórmula

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{calibrador}),$$

onde ΔCt (amostra) corresponde a um parâmetro de interesse a ser relativizado. Obtido o $\Delta\Delta Ct$, este é aplicado na fórmula

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct},$$

obtendo-se assim a quantidade relativa de $FOXP3^+$ expressa em determinada amostra.

2.3. Variáveis do Estudo:

Teste Tuberculínico - variável contínua em mm;

Número e percentagem de células T regs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$), por ml de sangue, para os ensaios imunológicos e de biologia molecular

2.4. Considerações éticas:

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Todos os voluntários que participaram leram, assinaram e receberam uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), antes da realização de qualquer procedimento do estudo.

2.5. Análises Estatísticas:

As médias e percentuais do número de células Treg/ μl foram comparadas entre os grupos com diferentes valores de reatividade ao TT e entre os grupos de idosos (doentes e sem TB) e de adultos jovens com TB pela correlação de Pearson. A diferença entre as médias nos diferentes grupos do estudo foi testada por meio da análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre proporções testadas pelo cálculo de qui-quadrado. Todas as decisões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS:

Para avaliar a presença de células Treg $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ em pacientes com ou sem TB doença foram feitos testes imunológicos e de biologia molecular utilizando diferentes técnicas de detecção, PCR real time e citometria de fluxo. Na análise citométrica foram usadas amostras sorológicas de sangue de 25 pacientes atendidos nas unidades de saúde (Tabela 1). Entretanto, para a técnica de PCR real time, que mensurou a expressão do gene $FOXP3^+$ que foi utilizado uma amostragem de 61 pacientes atendidos nas unidades de saúde (Tabela 2).



3.1. Células T regulatórias (Ensaio imunológico):

A análise dos dados da tabela 1 mostra que os percentuais médios de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ foram menores na população de idosos com TB ($23,16 \pm 13,73$) quando comparado com as médias dos grupos de idosos sem doença ($28,70 \pm 27,11$) e adultos doentes ($34,16 \pm 26,02$), porém as diferenças entre os grupos não foram significativas ($p = 0,404$).

Tabela 1. Distribuição do percentual de $FOXP3^+$ (GATE) com suas médias, na amostra de 25 pacientes, por grupo clínico, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

Diagnóstico Clínico		
Adulto com TB (n=9)	Idoso com TB (n=10)	Idoso sem TB (n=6)
GATE (%)*	GATE (%)*	GATE (%)*
7.47	0.55	4.14
55.78	12.86	8.14
8.18	29.32	49.55
56.80	33.06	4.71
-	45.06	37.47
82.91	33.65	68.24
9.44	7.33	
37.22	31.66	
34.83	19.14	
40.97	19.03	
Média $\pm$ (DP)	média $\pm$ (DP)	média $\pm$ (DP)
$34,16 \pm (26,02)$	$23,16 \pm (13,73)$	$28,70 \pm (27,11)$

* %GATE = corresponde ao percentual de $FOXP3^+$ entre as células $CD4^+CD25^+$
 $p = 0,404$

3.2. Células T regulatórias (Biologia Molecular):

Realizou-se a técnica de PCR em tempo real para identificar a expressão de $FOXP3^+$ nas células $CD4^+CD25^+$ em 61 pacientes.

Os idosos doentes demonstraram menos expressão do gene $FOXP3^+$ ($17,4 \pm 1,27$) em relação aos idosos sem TB doença ($18,0 \pm 0,99$) e adultos com TB ($18,5 \pm 2,15$). E os adultos com TB ($18,5 \pm 2,15$) correspondem ao grupo que mais expressam o gene $FOXP3^+$ ao comparar com os outros dois grupos. Porém, nenhuma comparação entre os grupos apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,603$) (Tabela 2).



Tabela 2. Nível de expressão de FOXP3⁺ identificado pela diferença dos valores do gene FOXP3⁺ e gene constante (DeltaCt- ΔCt) em 61 indivíduos, Recife (PE) em janeiro/2008 a dezembro/2009.

Adultos com TB (n=22)	Idosos com TB (n=18)	Idoso sem TB (n=21)
ΔCt*	ΔCt*	ΔCt*
17,82	16,37	17,31
18,11	19,23	17,57
16,84	17,80	17,84
19,50	16,77	18,21
17,24	17,49	16,32
-	15,35	16,81
20,79	18,37	16,65
21,32	15,97	17,60
22,23	14,84	18,19
23,45	17,51	-
19,00	16,37	18,41
17,42	19,05	-
17,72	18,56	19,90
16,48	19,41	18,61
14,84	18,14	19,67
19,58	17,70	17,29
18,41	17,93	16,99
14,99	17,04	18,94
-		18,70
17,69		18,31
18,34		19,24
17,25		
MÉDIA ± (DP) 18,5 ± (2,15)	MÉDIA 17,4 ± (1,27)	MÉDIA 18,0 ± (0,99)

*ΔCt = Ct_(FOXP3⁺) - Ct_(constante)

p = 0,603

3.3. Células T regulatórias e teste tuberculínico:

Ao analisar a correlação entre o resultado do TT em mm (variável contínua) e o percentual do sangue periférico CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ em 25 pacientes observou-se que só houve correlação estatisticamente significativa entre as duas variáveis no grupo de adultos com TB (p=0,004) (tabela 3). No entanto, verificou-se uma correlação



positiva entre a resposta do TT em mm e os níveis de FOXP3⁺ nos grupos de adultos (p=0,025) e idosos com TB (p=0,034) e uma correlação negativa entre a resposta do TT em mm e os níveis de FOXP3⁺ no grupo de idosos sem TB (tabela 4).

Tabela 3. Associação entre resposta ao TT em milímetros e percentual de células CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ em 25 pacientes atendidos em serviço de saúde no Recife (PE) no período de janeiro/2008 a dezembro/2009.

Grupos	Coefficiente de correlação de Pearson	valor de p
Idoso sem TB	-0,55	0,254
Idoso com TB	0,08	0,828
Adulto com TB	0,82	0,004

Tabela 4. Associação entre resposta ao TT em milímetros e percentual de FOXP3⁺ em 25 pacientes atendidos em serviço de saúde no Recife (PE) no período de janeiro/2008 a dezembro/2009.

Grupos	Coefficiente de correlação de Pearson	valor de p
Idoso sem TB	-0,74	0,092
Idoso com TB	0,71	0,034
Adulto com TB	0,70	0,025



4. DISCUSSÃO

A presente pesquisa identificou que o número de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ foi menor na população de idosos com TB em atividade quando comparado com os grupos de idosos sem doença e adultos doentes. Os estudos investigando o nível e funcionamento das células T regs na população de idosos ainda são limitados e têm resultados controversos.

Alguns trabalhos relatam que essas células mantêm sua atividade supressora, em humanos e camundongos idosos registrando níveis similares de células T regs em idosos, quando comparados com adultos (Valmori & Melo, 2005; Greeg et al, 2005; Sharma et al, 2006; Lages et al 2008). Outras pesquisas mostram que há um decréscimo na supressão mediada por células T regs em ratos e humanos idosos (Tsaknaridis et al, 2003; Zhao et al, 2007). Em outras publicações, contudo, os resultados apontam para um aumento na frequência dessas células em indivíduos idosos e uma correlação linear entre a prevalência de células T regs e idade (Greeg et al, 2005; Dejacó et al 2006; Lajes et al, 2008; Haynes, 2009).

Níveis elevados de T regs podem causar aumento da supressão de células T pró-inflamatórias e assim contribuir para o aumento da susceptibilidade a infecções, risco de neoplasia e resposta deficiente a vacina em indivíduos idosos (Dejacó et al 2006). Alternativamente, as células T regs podem ser menos funcionais no envelhecimento, levando a necessidade de baixa ocorrência para manter a tolerância (Tsaknaridis et al, 2003; Zhao et al, 2007).

Os nossos achados apontam para uma diminuição de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ em idosos com TB quando comparado aos outros grupos do estudo, o que poderia ser explicado por uma diminuição da resposta imune celular em decorrência da TB em atividade.

O grau de reatividade ao TT (em milímetros) esteve correlacionado com a produção de células Tregs apenas no grupo de adultos com TB ($p=0,004$). Por outro lado, verificou-se correlação positiva entre a resposta do TT e os níveis de $FOXP3^+$ nos grupos de adultos ($p=0,025$) e idosos com TB ($p=0,034$) e correlação negativa entre a resposta do TT em mm e os níveis de $FOXP3^+$ no grupo de idosos sem TB.

A resposta imune na TB é algumas vezes caracterizada por imunossupressão ativa, particularmente na doença avançada, como demonstrado na produção diminuída de IL-2 e IFN- γ e anergia antígeno-específica a preparações de PPD- Proteína utilizada para a aplicação do TT (Goldfeld et al, 2004; Delgado et al, 2002). A anergia ao PPD, que resulta na não reação na leitura do teste tuberculínico, é um fenômeno que ocorre em alguns indivíduos com tuberculose pulmonar ativa, e que pode ser correlacionada com alterações nos níveis de células T (Goldfeld, 2004). Esse fenômeno é observado com frequência em doenças microbianas crônicas envolvendo a participação de células T supressoras (Baecher-Allan, 2004).



As informações a respeito da relação entre as células T regulatórias não específicas presentes na epiderme e a reação de hipersensibilidade a injeção intradermal com tuberculina derivada de proteína purificada (PPD) são limitadas (Guyot-revol et al 2006; Mahan, et al, 2008; Vukmanovic-stejic et al, 2008). Estudo desenvolvido por Guyot-Revol e colaboradores (2006), mostrou que apesar das células T regulatórias não específicas estarem aumentadas no sangue de pacientes com TB ativa, apenas 2 de 27 pacientes com TB tiveram anergia a resposta ao teste tuberculínico.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam diminuição dos níveis de células T regulatórias na circulação periférica de pacientes idosos com TB e sugerem existir imunodepressão nesse grupo de indivíduos que pode estar relacionado à menor reatividade ao TT quando comparado com adultos com tuberculose.

No entanto, vale ressaltar que, com relação à investigação da frequência de células T regs $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ nosso estudo apresentou algumas limitações. Devido à dificuldade de coleta de sangue nos pacientes idosos, principalmente aqueles com estado de saúde debilitado pela doença, algumas amostras coletadas não apresentaram percentual de Treg suficiente que pudesse ser avaliado pela citometria de fluxo.

Paralelo ao ensaio por citometria de fluxo foi avaliada a expressão de $FOXP3^+$, marcador de células Treg por PCR em uma amostra de 61 pacientes. Os resultados moleculares de nosso estudo confirmam os achados no que diz respeito à avaliação imunológica, já que nos idosos com TB foi verificada menor expressão gênica do $FOXP3^+$ quando comparado com adultos com TB e idosos sem TB. E os adultos doentes expressaram níveis maiores de $FOXP3^+$ em relação aos idosos com e sem TB.

Mesmo diante da importância do assunto ainda existem poucos trabalhos na literatura abordando esta temática. Devemos destacar também que como se trata de um estudo imunológico em idosos os critérios de exclusão são bem restritivos, diminuindo o tamanho amostral.

O diagnóstico rápido e específico da TB é vital para o controle da infecção bacilar. Apesar do enorme problema de saúde pública mundial que a TB ocasiona, os recursos médicos são limitados. Nenhum agente quimioterápico ou biológico novo foi introduzido nos últimos 40 anos. A importância de mecanismos moleculares e celulares que regulem a interação parasito-hospedeiro, a fim de desenvolver métodos que combatam a TB.

Os resultados dessa pesquisa exploratória nos motivam para a realização de futuros ensaios com amostras maiores buscando uma maior interação entre os serviços de saúde e laboratórios especializados, o que contribuirá para a melhor compreensão da tuberculose em idosos.



AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação Estadual do Programa de Controle da Tuberculose de Pernambuco, pela disponibilidade em fornecer algumas informações importantes; aos profissionais de saúde da rede do Sistema Único de Saúde do município de Recife, pela cooperação na coleta dos dados; à Biblioteca Central da Universidade Federal de Pernambuco, pela ajuda na revisão bibliográfica; Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães por toda estrutura laboratorial e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio e financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BAECHER-ALLAN, C. & HAFLER, D.A. Supressor T cells in human diseases. The journal of Experimental Medicine, v. 200, p. 273-6, 2004.

CHAIMOWICZ, F. Tuberculose pulmonar em idoso. Parte I: epidemiologia e patogênese. Rev Bra Clín Terap., p. 217-223. 2001.

CHAIMOWICZ, F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in brazil. Rev saúde pública, v. 35, p. 81-87, 2001.

CHAIMOWICZ F. Tuberculose pulmonar. In: Freitas EV, Py L, Nery AL, Cançado FAX, Gorzone ML, Rocha SM. Tratado de geriatria e gerontologia. p. 362-73. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan. 2002.

CHEN, X., ZHOU, B., LI, M., DENG, Q., WU, X., LE, X., WU, CHI., LARMONIER, N., ZANG, W., ZHANG, H., WAANG, H., KATSANIS, E. Cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells suppress mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clinical Immunology, v. 123, p.50-59, 2007.

CHIACHIO, T., CASETTI, R., BUTERA, O., VANINI, V., CARRARA, S., GIRARDI, E., DI MITRI, D., BATTISTINI, L., MARTINI, F., BORSELLINO G ; GOLETTI. D. Characterization of regulatory T cells identified as CD4+CD25+CD39+ in patients with active tuberculosis. Clinical & Experimental Immunology, v. 156, p. 463-470, 2009.

CLARK, R.A. AND KUPPER, T.S. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. Blood, v. 109, p. 194-202, 2007.



DELGADO J.C et al. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. Proc Natl Acad Sci USA, v. 99, n. 11, p. 7576-7581, 2002.

DEJACO, C., DUFTNER, C., SCHIRMER, M. Are regulatory t – cells linked with aging?. Experimental gerontology, v. 41, p. 339-345, 2006.

DE JONG, B.C, ISRAELSKI, D.M., CORBETT, E.L & SMALL, P.M.. Clinical management of tuberculosis in the context of HIV infection. Annual Review of Medicine, v. 55, p.283-301, 2004.

Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC. Evaluation of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally, JAMA, v. 293, p. 2767–2775, 2005.

FREITAS, E. V; PY,L; NERY, A L; CANÇADO, FAX; GORZONE, ML; ROCHA, SM. Tratado de Geriatria e Gerontologia. p. 362-73. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2002.

GOLDFELD, A.E. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. Tuberculosis, v.84, p.76-81, 2004.

GREGG, R., C. M. SMITH, F. J. CLARK, D. DUNNION, N. KHAN, R. CHAKRAVERTY, L. NAYAK, AND P. A. MOSS. The number of human peripheral bloodCD4CD25high regulatory T cells increases with age. Clin. Exp. Immunol., v. 140, p. 540–546, 2005.

GUYOT- REVOL., INNES, J. A., HACKFORTH, S., AND LALVANI,A. Regulatory t cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. American journal of respiratory and critical care medicine, v. 173, p.803-810, 2006.

HAYNES, L., AND MAUE, A. C. Effects of aging on t cell function. Current opinion in immunology, v. 21, p. 414-417, 2009.

LAGES, C.S., SUFFIA, I., VELILLA, P.A., HUANG, B., WARSHAW, G., HILDEMAN, D.A., BELKAID, Y., CHOUGNET, C. Functional regulatory T cells accumulateinaged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. The Journal of Immunology, v. 181, p. 1835-1848, 2008.

LOSER, K; BEISSERT, S. Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity. Adv Dermatol., v. 23, p. 307-33, 2007.



MAHAN, C. S., THOMAS, J.J., BOOM, W. H. AND ROJAS R. E. Cd4+cd25+ fop3+ regulatory T cell downregulate human v62+ t – lymphocyte function triggered by anti – cd3 or phosphoantigen. British society for immunology, v. 127, p. 398-407, 2008.

RAJAGOPALAN S. Tuberculosis and aging: a global health problem. Clin Infect Dis., v. 33, n. 7, p. 1034-9, 2001.

RIBEIRO-RODRIGUES., CO, T. R., ROJAS, R., TOOSI, Z., DIETZE, R., BOOM, W. H., MACIEL, E. AND HIRSCH. A role for cd 4+cd25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. Clinical and experimental immunology. v. 144, p. 25 – 34, 2006.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Ann Rev Immunol, v.22, p.531-562, 2004.

SHARMA, S., A. L. DOMINGUEZ, AND J. LUSTGARTEN. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. J. Immunol., v. 177, p. 8348–8355, 2006.

SILVA JR, J.B. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. Jornal Brasileiro de Pneumologia, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180637132004000700003&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 22 nov. 2009.

TEIXEIRA, H. C., ABRAMO, C., MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. J Bra Pneumol., p. 323-334, 2007.

TENORIO, A. R., SPRITZLER, J., MARTINSON, J., GICHINGA, C. N., POLLARD, R. B., LEDERMAN, M. M., KALAYJIAN, R. C., LANDAY, A. L. The effect of aging on t – regulatory cell frequency in hiv infection. Clinical immunology, v. 130, p. 298-303, 2009.

TSAKNARIDIS, L., SPENCER, L., CULBERTSON, N., HICKS, K., TOCHA, D.L., CHOU, Y. K., WHITHAM, R. H., BAKKE, A., JONES, R. E., OFFNER, H., BOURDETTE, D. N., AND VANDENBARK, A. A. Functional assay for human cd4+cd25+ treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. Journal of neuroscience research, v. 74, p. 296-308, 2003.

TSAI, SY et al. Comparison of pulmonary tuberculosis in younger and elderly patients. Gaoxiong Yi Xue Ke Zue Za Zhi v.7, n.3, p.107-14, 1991.

VALMORI, D., A. MERLO, N. E. SOULEIMANIAN, C. S. HESDORFFER, AND M. AYYOUB. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. J. Clin. Invest., v. 115, p. 1953–1962, 2005.



VENDRAMINI SHF, Villa TCS, Cardozo Gonzales RI, Monroe A Tuberculose no idoso: análise do conceito. Rev Latino-am Enfermagem, v. 11, n. 1, p. 96-103, 2003.

VUKMANOVIC-STEJIC, M., AGIUS, E., BOOTH N., DUNNE P. J., LACY K. E., REED J. R., SOBANDE, S. K., SALMON, M., RUSTIN, M. H., AND AKBAR A.N. The kinetics of CD4+foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. The journal of clinical investigation, v.118, p. 3639-3650, 2008.



CONCLUSÕES



- 1- Concluí-se que poucos estudos têm avaliado o nível das células T regs na população idosa e a informação sobre essas células é limitada e controversa. Apenas um estudo demonstrou a associação entre a reatividade ao TT e os níveis de células T regs ($CD4^+CD25^+$) na população geriátrica.
- 2- A média em milímetros do resultado do TT dos três grupos: idosos e adultos com TB e idosos sem TB são diferentes e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$).
- 3- Foi identificado o ponto de corte de 5 mm do TT como aquele que melhor maximiza os valores de sensibilidade (0,61) e especificidade (0,78) para discriminar os idosos com TB doença dos idosos sem TB doença.
- 4- Os aspectos biológicos e de hábitos de vida como ter idade entre 60 a 69 anos, ser do sexo masculino, está desnutrido, beber e fumar foram características encontradas nos idosos com TB.
- 5- Encontrou-se diminuição dos níveis de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ (Tregs) na circulação periférica de pacientes idosos com TB que sugere ocorrer uma imunodepressão nos idosos com TB que por sua vez pode estar relacionado à menor reatividade ao TT encontrado nesse grupo quando comparado com adultos com tuberculose.



ANEXOS



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ Estudo da tuberculose em populações especiais: validação de métodos diagnósticos em co-infectados pelo HIV, idosos e crianças e análise da associação entre os níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos T reg e a reatividade ao teste tuberculínico em idosos		
DADOS GERAIS		
1. Unidade de Saúde	2. Distrito	3. Data da entrevista
		/ /
4. Número da ficha (Preenchido pelo coordenador)		
5. Número do prontuário do serviço de saúde		
6. Número do SINAN (Preenchido pelo coordenador)		
DADOS DO CASO ÍNDICE		
7. Nome do Paciente	7.1 Apelido	8. Sexo
		1. Masculino ☐ 2. Feminino ☐
9. Qual a sua idade	10. Qual a data do seu nascimento?	11. Data do início do tratamento (Preenchido pelo coordenador)
anos meses	/ /	/ /
12. Nome da Mãe		
13. Respondente	14. Nome do respondente (Caso não seja o paciente)	
1. Paciente 2. Filho 3. Cônjuge 4. Outro familiar 5. Outro acompanhante ☐		
15. Procedência	16. Com quem mora?	
1. Asilo 2. Comunidade 3. Hospital 8. Não informado ☐	1. Parente 2. Comunidade 3. Sozinho 4. Amigos ☐	
17. Normalmente, o Sr.(a) comparece ao serviço de saúde:		18. Hoje, com quem o Sr.(a) veio ao posto / hospital?
1. Sozinho 2. Acompanhado com familiar ☐ 3. Acompanhado não familiar		1. Sozinho 2. Acompanhado com familiar ☐ 3. Acompanhado não familiar
DADOS DO DOMICÍLIO		
19. Rua	20. Número	21. Apto
22. Ponto de referência		
23. Telefone		
Ramal		
24. Bairro		
Código do bairro		



HISTÓRIA DE CONTATO	
25. Conhece alguém com tuberculose? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 30) ☐ 8. Não sabe informar ☐	26. Quando esta pessoa esteve doente? 1. Agora está doente ☐ 2. Há menos de um ano ☐ 3. Há mais de um ano ☐ 4. Há mais de cinco anos ☐ 8. Não sabe informar ☐ 9. Inaplicável ☐
27. Qual o grau de contato do (a) Sr.(a) com essa pessoa com tuberculose ? Caso a resposta seja 1 ou 3, especificar. ☐ 1. Parente ☐ 2. Amigo ☐ 3. Outro ☐ 8. Não sabe informar ☐ 9. Inaplicável ☐	28. A pessoa com tuberculose dormia na mesma casa com o(a) Sr(a) (o paciente)? Caso a resposta seja 3, especificar. ☐ 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 3. Outro ☐ 8. Não sabe informar ☐ 9. Inaplicável ☐
29. Por quanto tempo essa pessoa conviveu com o (a) Sr.(a) (o paciente) enquanto ela estava doente? 	
HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL	
30. Há quanto tempo está doente? (quando iniciaram os sintomas da TB) dias ☐	31. Tem ou teve tosse? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 33) ☐ 8. Não sabe informar ☐
32. Tempo de tosse? dias ☐	33. Tem ou teve expectoração? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 35) ☐ 8. Não sabe informar ☐
34. Tem ou teve sangue na expectoração? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não sabe informar ☐	35. Tem ou teve febre? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 37) ☐ 8. Não sabe informar ☐
36. Tempo de febre? dias ☐	37. Tem ou teve aumento de gânglio ("landria")? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 39) ☐ 8. Não sabe informar ☐
38. Que parte do corpo refere aumento de gânglio ("landria")? (8. Não sabe informar; 9. Não se aplica) ☐	39. Tem ou teve suores noturnos? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não sabe informar ☐
40. Tem ou teve dores nas costas ou no peito? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não sabe informar ☐	41. Perdeu ou está perdendo peso? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 43) ☐ 8. Não sabe informar ☐
42. Quantos quilos? ☐	43. Tem outra doença atualmente? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 45) ☐ 8. Não sabe informar ☐
44. Qual doença? 	45. Quando procurou o primeiro serviço de saúde com queixas de TB?



ANTECEDENTES PESSOAIS	
46. Já teve diagnóstico de <i>diabetes melitus</i> feito por um médico? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não sabe informar ☐	47. Já teve diagnóstico de câncer feito por um médico? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não sabe informar ☐
48. Já fez tratamento para tuberculose alguma vez na sua vida? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 52) ☐ 8. Não sabe informar ☐	49. Quantos tratamentos para tuberculose o Sr (a) fez na sua vida? 1. Um tratamento ☐ 2. Dois tratamentos ☐ 3. Três tratamentos ☐ 9. Não se aplica ☐
50. Na ultima vez que fez tratamento para tuberculose ficou bom com o tratamento? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não se aplica ☐	51. Na ultima vez que fez o tratamento para tuberculose tomou os remédios durante todo o tempo que o médico disse para tomar? 1. Sim ☐ 2. Não ☐ 8. Não sabe informar ☐ 9. Não se aplica ☐
52. Qual o principal motivo para o Sr (a) deixar de tomar os remédios (no último tratamento) Caso a resposta seja 7, especificar. 1. Não se deu bem com a medicação 2. Não tinha dinheiro para o transporte até o posto 3. Estava se sentindo bem e achou que não precisava mais de tomar os remédios. 4. Não tinha tempo de ir ao posto.	5. Não era bem atendido no posto ☐ 6. Faltou remédio no posto 7. Outro motivo ☐ 9. Não se aplica ☐
53. Na sua vida inteira, você já tomou pelo menos 8 drinks (Por drink, eu quero dizer meia cerveja, um copo de vinho ou uma dose de destilado (pinga, whisky, etc.) de qualquer tipo de bebida alcoólica)? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para a questão 59) ☐	54. Já houve algum período na sua vida em que em um ano você tomou pelo menos 8 drinks contendo álcool ? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para a questão 59) ☐
55. Durante os últimos 30 dias, você bebeu pelo menos uma dose de alguma bebida alcoólica? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para a questão 59) ☐	56. Durante os últimos 3 meses, com que frequência você geralmente tomou cerveja, vinho, pinga ou qualquer outro tipo de bebida alcoólica? 1. Todos os dias ☐ 2. Quase todos os dias ☐ 3. 3 a 4 dias por semana ☐ 4. 1 a 2 dias por semana ☐ 5. 2 a 3 dias por mês ☐ 6. uma vez por mês ☐ 7. Menos de uma vez por mês ☐
57. Nos dias em que você bebeu nos últimos 3 meses quantos drinks você geralmente tomou num único dia ? Por drink, eu quero dizer meia cerveja, um copo de vinho ou uma dose de destilado (pinga, whisky, etc.) ? 99. Não se aplica ☐	58. Você está atualmente em tratamento para um problema com o álcool (e droga)? 1. Sim ☐ 2. Não ☐



59. A classificação quanto ao uso de bebida alcoólica (preenchido pelos coordenadores estaduais)					
1. Abstinência 2. Bebedor leve (Para homens, o produto da questão 54 pela 55, menor que 21 e mulher menor de 14) 3. Bebedor pesado (Para homens, o produto da questão 54 pela 55, maior ou igual a 21 e mulher maior ou igual a 14) 4. Dependente do álcool (Caso tenha respondido sim na questão 56). Dependente de álcool					
60. O Sr fuma cigarros regularmente? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para a questão 64) 3. Fumou, mas parou (Siga para a questão 62) 8. Não sabe informar			61. Quantos cigarros o Sr fuma? 1. 1 a 10 cigarros (até meio maço) por dia 2. 11 a 20 cigarros (meio a um maço) por dia 3. mais de 20 cigarros (mais de um maço) 4. de um a dez cigarros por semana 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		
62. Com que idade o Sr começou a fumar? _____ anos ☐ 8. Não sabe informar			63. Há quanto tempo parou de fumar? 1. _____ meses 2. _____ anos ☐ 8. Não sabe informar 9. Não se aplica		
64. Até agora, quantos cigarros o Sr. acha que fumou durante a sua vida inteira? 1. Entre 1 e 100 cigarros (até 5 maços) 2. Mais de 100 cigarros (mais de 5 maços) 3. Não sabe informar.			65. O Sr (a) já fez teste de AIDS alguma vez? 1. Sim e foi positivo 2. Sim e foi negativo 3. Não fez 4. Não sabe 8. Não informou		
66. Peso _____		67. Altura _____		68. IMC _____	
69. O Sr (a), recebe a visita da equipe do PSF na sua casa ? 1. Sim 8. Não sabe informar 2. Não					
EXAME DE LABORATÓRIO					
70. Realizou baciloscopia? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 72) 8. Não sabe informar			71. Resultado da baciloscopia realizada ? 1. Positiva 2. Negativa 3. Não realizou _____ / _____ / _____ Cruzes		
72. Resultado da baciloscopia da pesquisa? 1. Positiva ☐ 2. Negativa 3. Não realizou _____ / _____ / _____ Cruzes			73. Realizou cultura? 1. Sim ☐ 2. Não (Siga para questão 77) 8. Não sabe informar		
74. Resultado da cultura realizada ? 1. Positiva 2. Negativa 3. Não realizou _____ / _____ / _____			75. Resultado da cultura da pesquisa? 1. Positivo 2. Negativo 9. Não realizou _____ / _____ / _____		
76. Resultado do teste de sensibilidade 1. Sensível 2. Resistente 3. Não testada					
76.1. INH ☐	76.2. RMP ☐	76.3. PZA ☐	76.4. SM ☐	76.5. EMB ☐	76.6. ETH ☐
77. Material da coleta? 1. Escarro 2. Outro _____			78. Realizou TT anteriormente? 1. Sim 2. Não (Siga para questão 81) 8. Não sabe informar		
79. Qual o resultado? _____			80. Realizou TT pela pesquisa? 1. Sim 2. Não (Siga para questão 75) 8. Não sabe informar		
81. Resultado do TT feita pela pesquisa? 1. Não reator (0 a 4 mm) 2. Reator fraco (5 a 9 mm) 3. Reator forte (≥ 10 mm) _____ / _____ / _____ mm					



82. Outros exames não especificados acima (Ex: PCR, Broncoscopia) 1. Positiva 2. Negativa <input style="width: 30px; height: 20px; margin-bottom: 5px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px; margin-bottom: 5px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px; margin-bottom: 5px;" type="checkbox"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
83. Tem radiografia do tórax? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
83.2 Padrão radiológico unilateral bilateral? 01. Normal 02. Infiltrado focal 03. Infiltrado difuso 04. Cavidade única 05. Cavidades múltiplas 06. Micronodular 07. Alveolar 08. Alveolo intersticial 09. Nodular Mista 10. Adenomegalias 11. Derrame pleural 12. Espessamento pleural apical 13. Outros 99. Não realizado <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	83.1 Padrão radiológico? 1. Unilateral 2. Bilateral <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
84. Sorologia para HIV: (ELISA/Imunofluorescência ou WESTERN BLOT) 01. Positiva 02. Negativa 03. Inconclusiva 04. Não realizada <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	85. Data da realização da sorologia para HIV ____ / ____ / ____
86. Resultado da dosagem de Linfócitos CD4 ____ CD8 ____ CD4 CD25 ____	87. Resultado da dosagem de FOXP3 1. Expresso 2. Não expresso ____
88. Evolução: (Preenchido pelo coordenador) 01. Alta por cura comprovada 02. Alta por completar o tratamento 03. Alta por abandono 04. Alta por óbito. 05. Alta por falência 06. Alta por mudança de diagnóstico 07. Alta por transferência 08. Sem informação <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
89. Diagnóstico (Preenchido pelo coordenador) 01. Pulmonar (apenas) 02. Pulmonar e extrapulmonar 03. Extrapulmonar 04. Pleural 05. Miliar 06. Ganglionar 07. Óssea 08. Meníngea 09. Outra <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	
90. Tratamento realizado 1. Esquema I – INH + RMP por 6 meses PZA por 2 meses 2. Esquema IR – INH + RMP + EMB por 6 meses PZA por 2 meses 3. Esquema III – SM + PZA por 3 meses ETH + EM por 12 meses <input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>	



APÊNDICES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Estudo da tuberculose em populações especiais: validação de métodos diagnósticos em co-infectados pelo HIV, idosos e crianças e avaliação da transmissão hospitalar da tuberculose e efeito do HAART em pacientes co-infectados pelo HIV

Sub-projeto 1A: Validação do teste PCR em paciente infectados pelo HIV, idosos e crianças com suspeita de tuberculose

Sub-projeto 4: Análise da associação entre os níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos T reg e a reatividade ao teste tuberculínico em idosos

Instituição executora: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –FIOCRUZ

(participante com idade $\geq$ 60 anos)

Nome _____ do
participante: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Prezado Sr.(a):

Os pacientes idosos fazem parte de um grupo especial de pessoas que têm maiores chances de desenvolver tuberculose, formas mais graves da doença e, algumas vezes, comprometimento de outros locais que não o pulmão. Isso acontece porque, em geral, o organismo do idoso se defende menos da doença. Nos idosos também é freqüente o atraso na confirmação da tuberculose porque os exames normalmente usados não são capazes de identificar a presença do germe responsável pela doença e isso faz com que muitas vezes o tratamento só se inicie quando a tuberculose já está avançada. Por essa razão, estamos realizando uma pesquisa para avaliar a capacidade de um novo tipo de exame de sangue chamado teste de PCR, que pode identificar a presença do germe da tuberculose no sangue, no escarro ou em material de outra região do organismo comprometida pela doença. Além disso, queremos estudar a atividade de uma parte do sangue (células) que é responsável pela defesa do nosso organismo contra várias doenças, inclusive o germe da tuberculose. Pretendemos saber se o comportamento dessas células nos idosos com tuberculose é diferente dos jovens com tuberculose. O estudo dessas células pode ajudar a descobrir novos tipos de tratamento para tuberculose. Além disso,



queremos saber se o surgimento da reação que aparece na pele de pessoas afetadas pelo germe da tuberculose, após o teste de Mantoux (teste tuberculínico), se relaciona com a quantidade dessas células de defesa que existem no sangue. O teste de Mantoux (teste tuberculínico), feito normalmente nos serviços de saúde para ajudar a esclarecer se a pessoa tem ou não tuberculose, é um exame onde se injeta uma pequena quantidade de uma substância que faz parte do germe da tuberculose no braço. Se o germe da tuberculose estiver no organismo da pessoa, aparece uma reação avermelhada na área em torno do local da picada, dois ou três dias após a realização do exame.

Caso o (a) senhor (a) concorde em participar do estudo, o que precisamos fazer é: 1º) Aplicar um questionário onde faremos perguntas relacionadas a sua doença; 2º) realizar os exames que fazem parte da rotina nas pessoas que apresentam sinais e sintomas suspeitos de tuberculose (RX de tórax; teste de Mantoux, exame e cultura do escarro ou de outro material se a tuberculose estiver fora do pulmão, além do teste para o vírus da aids); 3º) coletar uma amostra 25 ml de sangue retirado da veia periférica (braço) para o exame da PCR, para o estudo das

células de defesa do sangue e para o teste para a identificação do vírus. Esclarecemos que a coleta do sangue será feita por profissional experiente e que os riscos serão mínimos, pois é um procedimento rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e a punção será feita com seringas e agulhas descartáveis. Porém, a picada da agulha pode causar desconforto no local e eventualmente haver formação de um pequeno hematoma, ou seja, uma mancha roxa no local da picada. A coleta de escarro será espontânea, após tosse. Parte do material coletado (sangue e escarro) deverá ser armazenada para utilização futura em pesquisa, que caso ocorra, deverá ter nova autorização do sr(a) para que o material possa ser utilizado. Será resguardado sigilo absoluto durante todo o período da pesquisa, bem como da publicação dos resultados em revistas especializadas, em cursos e/ou congressos médicos. Ao participar, o (a) senhor (a) estará contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre a tuberculose em pessoas idosas e tem garantido os seguintes direitos:

- 1 - A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa.
- 2 - A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos cuidados e tratamento.
- 3 - A segurança de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial da informação, com a sua privacidade.
- 4 - O compromisso de receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a sua vontade de continuar participando.

Se o senhor (a) concordar, a gente pede que assine este papel em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, dizendo que entendeu as explicações e que está concordando. Se o senhor (a) não quiser participar, isso não vai mudar o seu atendimento no serviço e os exames que o seu médico solicitou serão realizados do mesmo jeito.



Eu. _____ RGnº _____
abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos acima
relacionados, concordo em participar.

Recife, _____ de _____ de 20 ____

Assinatura do paciente: _____

1ª testemunha: _____

Assinatura do médico ou coordenador:

Obs: Em caso de dúvidas ou questionamentos contatar os coordenadores locais da pesquisa e
médicos, a Dra. Zilda Cavalcanti pelo telefone: 99761531 ou Dra Cynthia Braga pelo telefone:
21012577.

Informações sobre o andamento da pesquisa podem ser encontradas no site do Sistema
Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP):

<http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/menuusuario.cfm>



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (ANEXO)

Título do Projeto: Estudo da tuberculose em populações especiais: validação de métodos diagnósticos em co-infectados pelo HIV, idosos e crianças e avaliação da transmissão hospitalar da tuberculose e efeito do HAART em pacientes co-infectados pelo HIV

Sub-projeto 1A: Validação do teste PCR em paciente infectados pelo HIV, idosos e crianças com suspeita de tuberculose

Sub-projeto 4: Análise da associação entre os níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos T reg e a reatividade ao teste tuberculínico em idosos

Instituição executora: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –FIOCRUZ

Prezado Sr.(a):

Gostaria de pedir sua permissão para ficar com o exame de raios-X para efeito de melhor análise do mesmo. Se o senhor (a) concordar, a gente pede que assine este papel em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, dizendo que entendeu as explicações e que está concordando. Se o senhor (a) não permitir, isso não vai mudar o seu atendimento no serviço e os exames que o seu médico solicitou serão realizados do mesmo jeito.

Eu, _____ RG nº _____
abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos acima relacionados, concordo em participar.

Recife, _____ de _____ de 20 ____

Assinatura do paciente: _____

1ª testemunha: _____



Assinatura do médico ou coordenador:

Obs: Em caso de dúvidas ou questionamentos contatar os coordenadores locais da pesquisa e médicos, a Dra. Zilda Cavalcanti pelo telefone: 99761531 ou Dra Cynthia Braga pelo telefone: 21012577.

Informações sobre o andamento da pesquisa podem ser encontradas no site do Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP):

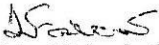
<http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/menuusuario.cfm>



PREFEITURA DO
RECIFE

Carta de Anuência

Declaramos para os devidos fins que autorizamos a realização da pesquisa **“Estudo da tuberculose em populações especiais: validação de métodos diagnósticos em co-infectados pelo HIV, idosos e crianças e avaliação da transmissão hospitalar da tuberculose e efeito do HAART em pacientes co-infectados pelo HIV”**, nas Policlínicas Lessa de Andrade, Agamenon Magalhães e Centro de Saúde Clementino Fraga, coordenado pela Dra. Cynthia Braga pesquisadora do Centro Ageu Magalhães.


p) **Evaldo Melo de Oliveira**
Secretário de Saúde



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

Recife, 28 de julho de 2008

Prezado colega,

Gostaríamos de solicitar a sua colaboração na coleta de informações para a pesquisa intitulada **“Análise da associação entre os níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos T reg e a reatividade ao teste tuberculínico no idoso”**, que vem sendo realizada em pacientes com quadro suspeito de tuberculose, atendidos nos serviços de saúde do Recife, e com idade ≥ 60 anos. Essa pesquisa, que foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e conta com a anuência da Secretaria de Saúde do município, pretende esclarecer aspectos da resposta imune dos idosos à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* que poderão ajudar no desenvolvimento de novas terapias e para a melhoria da assistência aos pacientes idosos com tuberculose. Sendo assim, caso identifique algum paciente idoso (≥ 60 anos) com quadro suspeito de tuberculose na área de abrangência da sua unidade de saúde, solicitamos a gentileza de entrar em contato com um dos nossos pesquisadores, ligando a cobrar para:

Cíntia Brito- 88473280 ou Renata Regis- 94384944

Atenciosamente,


Maria Cynthia Braga
Departamento de Parasitologia
Mat. SIAPE - 1288286
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ
Coordenadora da Pesquisa


Júlia Vilela

Coordenadora do Programa de Tuberculose do Recife



Título do Projeto: Estudo da tuberculose em populações especiais: validação de métodos diagnósticos em co-infectados pelo HIV, idosos e crianças e avaliação da transmissão hospitalar da tuberculose e efeito do HAART em pacientes co-infectados pelo HIV

Pesquisador responsável: Maria Cynthia Braga

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 26/02/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: C

Registro no CAAE: 0007.0.095.000-07

Após analisar o projeto modificado, em sua **5ª versão**, apresentado em 26 de maio de 2008, o Comitê de Ética em Pesquisa faz os seguintes comentários / considerações:

- Carta de Anuência – apresentar carta de anuência do Hospital Otávio de Freitas (novo sítio da pesquisa).
- Resumo – Não foi incluído o grupo de idosos sem tuberculose que passarão a fazer parte do estudo.

Diante do exposto, o CEP/CPqAM, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a seguinte recomendação:

- Que sejam atendidos os itens acima.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Ressalta-se, ainda, que as recomendações propostas deverão ser atendidas no prazo de 30 dias para emissão do parecer final.

Recife, 10 de junho de 2008.

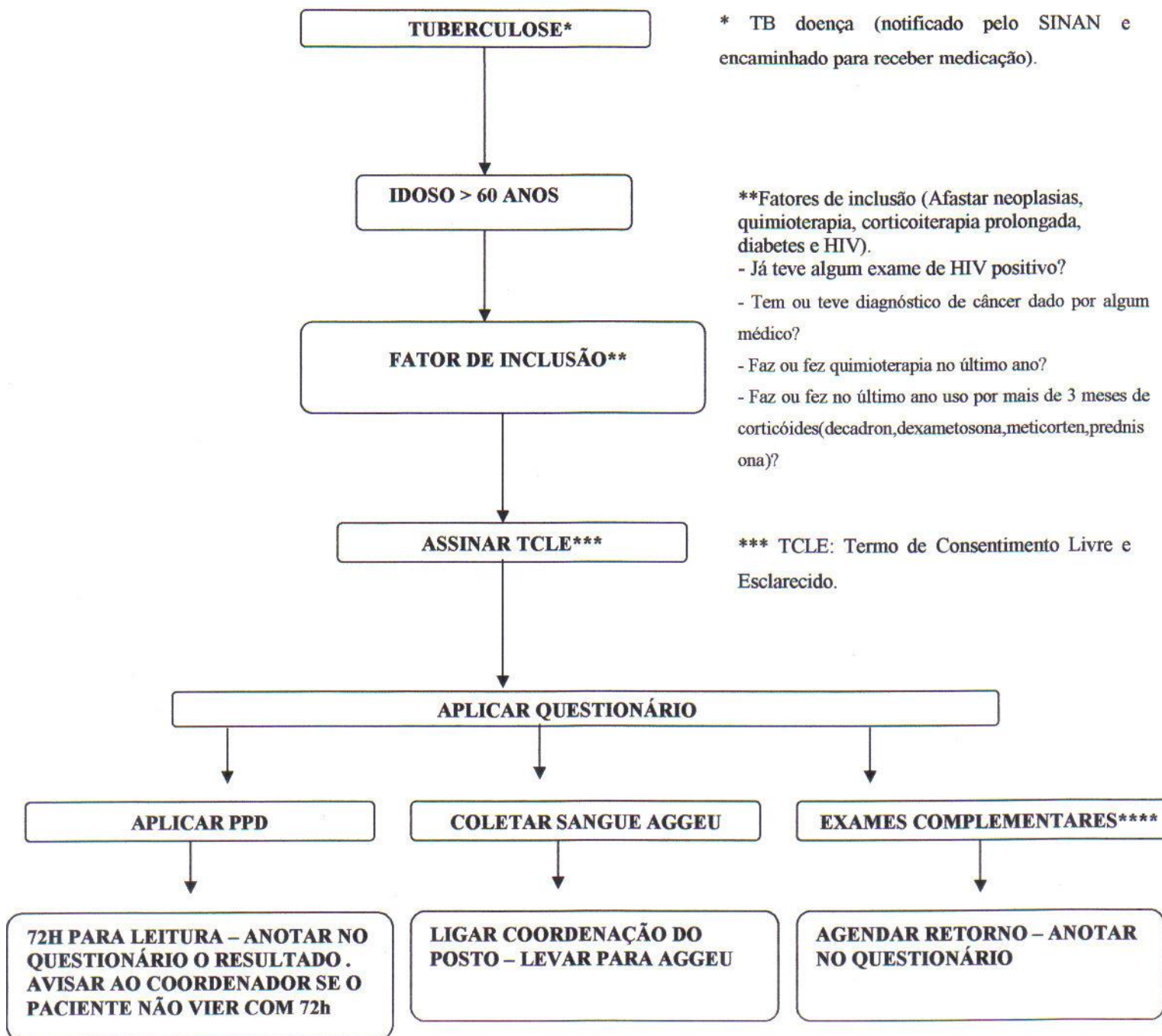

 Dr.ª Zilda Maria de Medeiros
 Biomédica
 Coordenadora
 CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.870-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comite.de.etica@cpqam.fiocruz.br





FLUXOGRAMA PARA IDOSO DOENTE

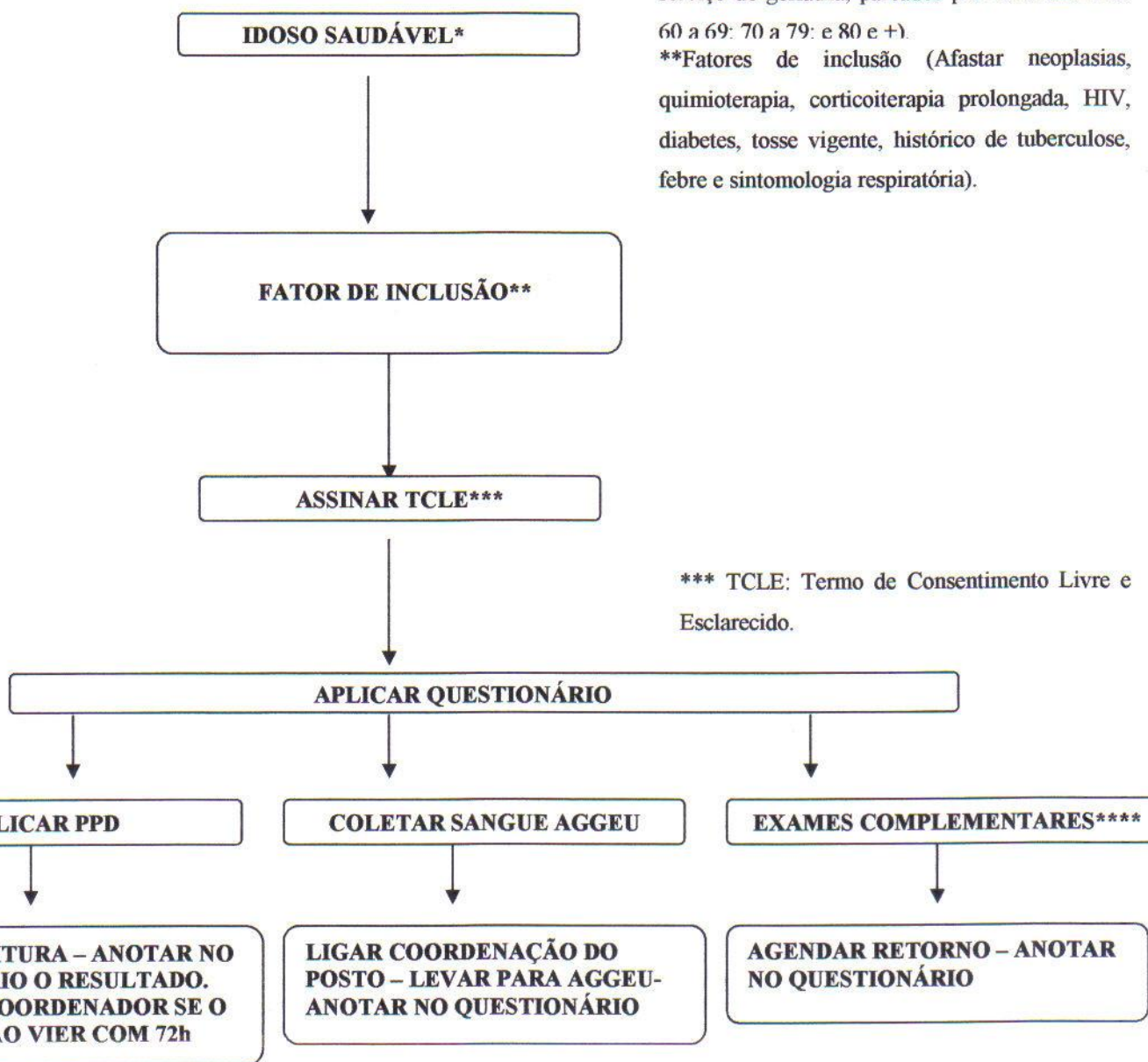




FLUXOGRAMA PARA IDOSO SAUDÁVEL

* Idoso saudável (Sem TB doença): > 60 anos, serviço de geriatria, pareados por faixa etária de 60 a 69; 70 a 79; e 80 e +).

**Fatores de inclusão (Afastar neoplasias, quimioterapia, corticoiterapia prolongada, HIV, diabetes, tosse vigente, histórico de tuberculose, febre e sintomologia respiratória).



*** TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**** Exames complementares: hemograma, glicemia, uréia, creatinina, anti-HIV e raios-X do tórax.



FLUXOGRAMA PARA ADULTO DOENTE

TUBERCULOSE*

* TB doença (notificado pelo SINAN e encaminhado para receber medicação).

**ADULTO JOVEM
20-49 ANOS**

**Fatores de inclusão (Afastar neoplasias, quimioterapia, corticoiterapia prolongada, diabetes e HIV).

FATOR DE INCLUSÃO**

ASSINAR TCLE***

*** TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

APLICAR QUESTIONÁRIO

APLICAR PPD

72H PARA LEITURA – ANOTAR NO QUESTIONÁRIO O RESULTADO. AVISAR AO COORDENADOR SE O PACIENTE NÃO VIER COM 72h

COLETAR SANGUE AGGEU

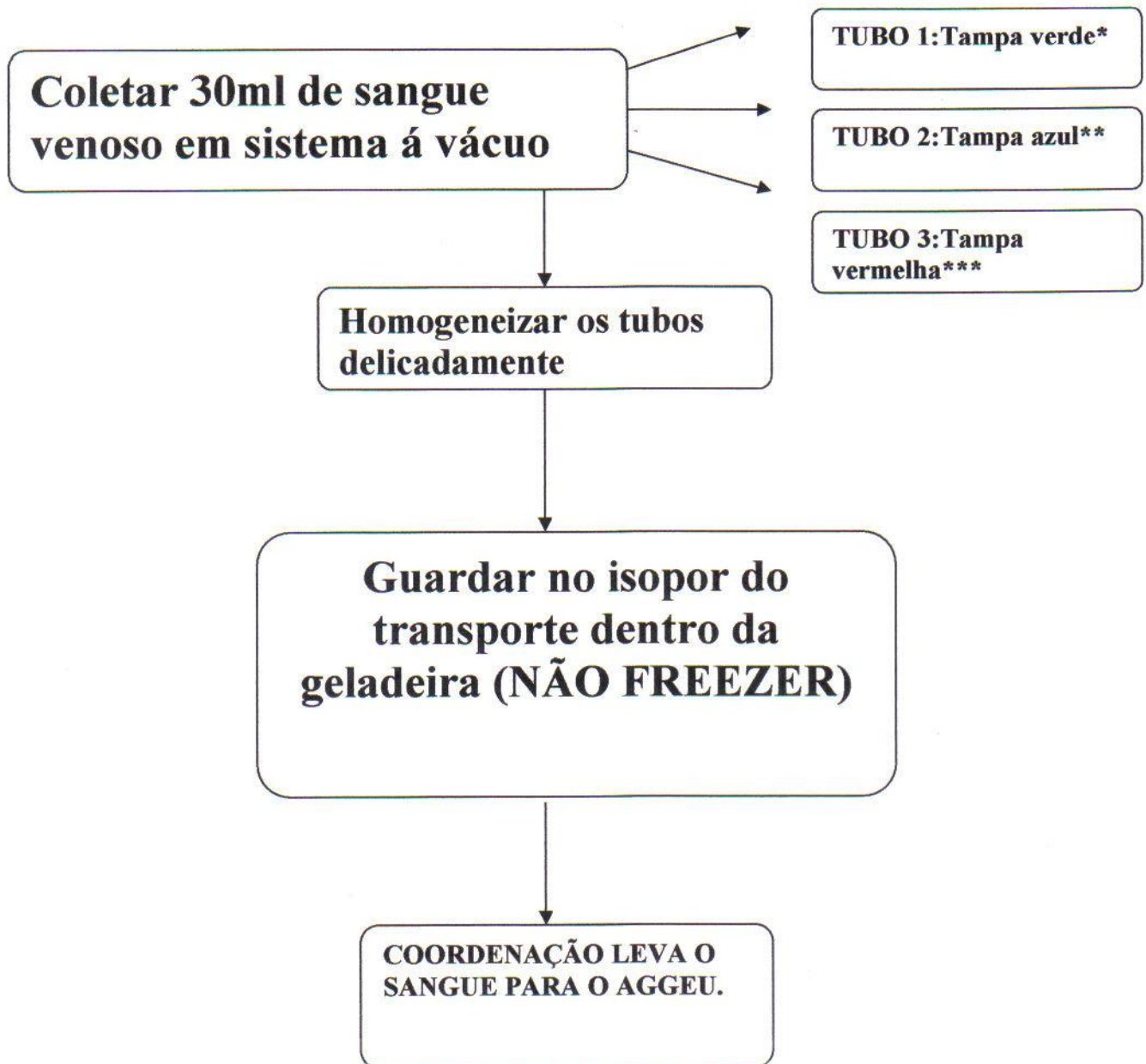
LIGAR COORDENAÇÃO DO POSTO – LEVAR PARA O AGGEU

EXAMES COMPLEMENTARES****

AGENDAR RETORNO – ANOTAR NO QUESTIONÁRIO

**** Exames complementares: Solicitar baciloscopia, hemograma, glicemia, uréia, creatinina, anti-HIV e raios-X do tórax (se necessário).

Fluxograma do Sangue



LEGENDA:

* 20ml de Heparina sódica

** 5ml de Citrato de sódio

*** 5ml de Soro