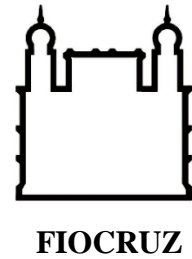




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS RESPONSIVOS AOS EXTRATOS
LIPÍDICOS DO *Mycobacterium tuberculosis***

LUANA EVANGELISTA DE ARAÚJO

**Salvador – Bahia
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS RESPONSIVOS AOS EXTRATOS
LIPÍDICOS DO *Mycobacterium tuberculosis***

LUANA EVANGELISTA DE ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Patologia Humana para a obtenção do grau de
Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marcos Arruda

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz Silva

**Salvador – Bahia
2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

A663d Araújo, Luana Evangelista de.

Detecção de anticorpos séricos responsivos aos extratos lipídicos do *Mycobacterium tuberculosis*/ Luana Evangelista de Araújo. – Salvador, 2022.

64 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marcos Arruda

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz Silva

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Tuberculose. 2 Lipídios. 3. Testes sorológicos. I. Título.

CDU 616-006191

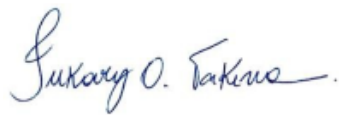
"DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS RESPONSIVOS AOS EXTRATOS LIPÍDICOS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS".

Luana Evangelista de Araújo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 13 de junho de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Lukary Oliveira Takenami
Professora
UNIVASF



Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Sérgio Marcos Arruda
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com a concessão de bolsa e por meio do Programa de Expansão da Educação Profissional (PROEP).

Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) do Ministério da Saúde e administrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia.

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido forças, sabedoria, resiliência e coragem sempre que necessário.

A meus pais e meu irmão Felipe, por serem meu suporte, meu porto seguro, maiores incentivadores da minha jornada profissional e pessoal.

Ao meu orientador Dr. Sérgio Arruda e meu coorientador Dr. Adriano Queiroz, pela confiança, incentivo, auxílio e pelas oportunidades oferecidas na minha jornada acadêmica, desde a iniciação científica e durante todo o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

Ao Dr. Fred Luciano, pelas colaborações imprescindíveis nas análises dos dados do trabalho. Ao Felipe Rocha, pela contribuição em todos os momentos que precisei tirar dúvidas na elaboração dos experimentos. Ao Dr. Thiago Marconi, por toda contribuição com seus ensinamentos na teoria e práticas laboratoriais.

Ao Bruno Rios, todos meus amigos e familiares pelo companheirismo, amor e carinho na vida e durante a elaboração dessa dissertação.

A família TB LASP, por todo companheirismo, parceria e amizade tão importantes durante essa jornada.

A equipe do Laboratório LAPEC, por serem tão receptivos durante a reforma do LASP, permitindo que me sentisse à vontade neste para fazer meus experimentos do mestrado.

Aos professores e colegas do PgPAT, pelo entusiasmo na troca de conhecimento e experiências.

A todos que, de alguma forma, participaram deste momento.

“Investir em conhecimento
é a certeza de um retorno garantido
para toda vida”.

(João Rubens)

ARAÚJO, Luana Evangelista de. **Detecção de anticorpos séricos aos extratos lipídicos do *Mycobacterium tuberculosis***. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Tuberculose (TB), doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é considerada um grave problema para a saúde pública. Cerca de 40% do peso seco da parede do Mtb é composta por lipídios. Grande parte do genoma bacteriano é dedicado à biossíntese e degradação dessas moléculas. O Mtb contém transportadores os quais estão envolvidos na importação desses lipídios através da parede celular que são codificados pelos operons mce 1 a 4. Em um estudo recente, foi demonstrado em modelo *in vitro* que o Mtb, ao reprimir a expressão do operon mce1, é capaz de modificar a composição lipídica de sua parede celular, acumulando ácidos micólicos livres. Outro estudo demonstrou que os lipídios do Mtb apresentam capacidade distinta de ativar a resposta pró-inflamatória em macrófagos murinos e em células T humanas. Assim, por serem moléculas importantes para a virulência do bacilo e por serem capazes também de estimular uma resposta imune celular no hospedeiro, nessa dissertação, exploramos se os lipídios do Mtb são capazes de estimular uma resposta humoral com a produção de imunoglobulinas (Igs) que possam ser detectadas no soro humano, em diferentes populações. **OBJETIVO:** Avaliar os níveis de IgG e IgM responsivos aos extratos lipídicos do Mtb, da cepa selvagem e mutante no operon mce1, além de identificar se essas Igs podem ser exploradas como possíveis marcadores de doença e infecção tuberculosa. **MATERIAL E MÉTODOS:** Voluntários foram convidados para participar de um estudo de corte transversal mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os soros desses indivíduos foram coletados e armazenados a -80°C até a sua utilização. Ensaios de ELISA foram realizados para identificar a detecção de anticorpos IgG e IgM contra os extratos lipídicos do Mtb adsorvidos nas placas. Inicialmente foi feita a avaliação dos níveis dessas Igs em todos os grupos testados no estudo, em seguida, foi realizada a avaliação desses níveis através do índice de reatividade (IR), média geométrica e intervalo de confiança (IC) de 95%, além disso alguns parâmetros de desempenho dos testes foram avaliados como curva ROC, sensibilidade, especificidade, acurácia, dentre outros. **RESULTADOS:** Pela avaliação do desempenho dos ensaios realizados para diagnóstico, observa-se que não há uma diferença significativa na dosagem dos anticorpos entre os grupos em estímulo aos extratos lipídicos do Mtb de ambas as cepas, com exceção dos níveis de IgG e IgM em estímulo aos lipídios da cepa selvagem no grupo de indivíduos com outras doenças pulmonares (ODP) em relação aos demais. **CONCLUSÃO:** Os extratos lipídicos do Mtb apresentaram capacidade limitada em diferenciar os grupos testados no estudo pelas dosagens de IgG e IgM. Entretanto, observou-se um aumento nos títulos de anticorpos responsivos aos extratos lipídicos do Mtb no grupo ODP, o qual pode ser explorado como um teste diferencial de triagem. Além disso, mais estudos devem ser realizados buscando avaliar o papel de espécies lipídicas isoladas do Mtb como possíveis marcadores de prognóstico ou diagnóstico da doença, como forma de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes.

Palavras-chave: Tuberculose. Lipídios. Testes sorológicos.

ARAÚJO, Luana Evangelista de. **Detection of serum antibodies to lipid extracts of *Mycobacterium tuberculosis***. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis (TB), a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), is considered a serious public health problem. About 40% of the dry weight of the Mtb wall is composed of lipids. Much of the bacterial genome is dedicated to the biosynthesis and degradation of these molecules. Mtb contains transporters which are involved in the import of these lipids through the cell wall that are encoded by the *mce* 1 to 4 operons. In a recent study, it was demonstrated in an in vitro model that Mtb, by repressing the expression of the *mce1* operon, can modify the lipid composition of its cell wall accumulating free mycolic acids. Another study demonstrated that Mtb lipids have a distinct ability to activate the pro-inflammatory response in murine macrophages and in human T cells. Thus, as they are important molecules for the virulence of the bacillus and because they are also capable of stimulating a cellular immune response in the host, in this dissertation, we explore whether Mtb lipids can stimulate a humoral response with the production of immunoglobulins (Igs) that can be detected in human serum in different populations. **AIM:** To evaluate the levels of IgG and IgM responsive to lipid extracts of Mtb virulent wild-type strain and the mutant in the *mce1* operon, in addition to identifying whether these Igs can be explored as possible markers of tuberculosis disease and infection. **MATERIAL AND METHODS:** Volunteers were invited to participate in a cross-sectional study by signing an informed consent form (ICF). Sera from these individuals were collected and stored at -80°C until use. ELISA assays were performed to identify the detection of IgG and IgM antibodies against the lipid extracts of Mtb adsorbed on plates. Initially, the levels of these Igs were evaluated in all groups tested in the study, then the evaluation of these levels was carried out through the reactivity index (RI), geometric mean and confidence interval (CI) of 95%, in addition some test performance parameters were evaluated, such as ROC curve, sensitivity, specificity, accuracy, among others. **RESULTS:** By evaluating the performance of the tests performed for diagnosis, it is observed that there is no significant difference in the dosage of antibodies between the groups in stimulation of lipid extracts of Mtb of both strains, with the exception of levels of IgG and IgM in stimulation of lipids of the wild strain in the group of individuals with other pulmonary diseases (OPD) in relation to the others. **CONCLUSION:** The lipid extracts of Mtb showed limited ability to differentiate the groups tested in the study by the dosages of IgG and IgM. However, an increase in antibody titers responsive to Mtb lipid extracts was observed in the OPD group, which can be explored as a differential screening test. In addition, further studies should be carried out seeking to assess the role of lipid species isolated from Mtb as possible markers of prognosis or diagnosis of the disease, as a way of increasing the sensitivity and specificity of the tests.

Keywords: Tuberculosis. Lipids. Serological tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de progressão da tuberculose	17
Figura 2. Incidência de TB nos países que notificaram, pelo menos, 100.000 casos em 2020.....	18
Figura 3. Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.). Unidade Federada, 2021.....	19
Figura 4. Mecanismos pelos quais as células B moldam a resposta imune ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Figura 5. Representação esquemática do envelope celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
Figura 6. Representação experimental do estudo.	31
Figura 7. Avaliação dos níveis de IgG e IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa selvagem (WT) pelo teste de ELISA.....	38
Figura 8. Avaliação dos níveis de IgG e IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa mutante ($\Delta mce1$) pelo teste de ELISA.....	39
Figura 9. Avaliação do desempenho do extrato lipídico da cepa selvagem (WT) usando a dosagem de IgG e IgM no teste de ELISA.....	41
Figura 10. Avaliação do desempenho do extrato lipídico da cepa mutante ($\Delta mce1$) usando a dosagem de IgG e IgM no teste de ELISA.....	42
Figura 11. Representação gráfica de intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de WT IgG, WT IgM, $\Delta mce1$ IgG e $\Delta mce1$ IgM	43
Figura 12. Avaliação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos imunoenaios	44
Figura 13. Diferentes regiões anatômicas do pulmão, representando assinaturas microbianas únicas	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos da população do estudo.....	37
Tabela 2. Resumo de alterações microbianas pulmonares documentadas devido a fatores ambientais e doenças	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	Anticorpos
Acc	Acurácia
ADF	Amplificação por deslocamento de fita
AG	Arabinogalactano
Ag	Antígeno
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AM	Ácidos micólicos
APC	Célula apresentadora de antígeno
AUC	Área sobre a curva
BAAR	Bácilo Álcool Ácido Resistente
BCG	<i>Bacille Calmette-Guerin</i>
BSA	Albumina de soro bovino
C1q	Proteína do sistema complemento
CCL4	Ligante de quimiocina 4
CCR	Câncer colorretal
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CFP-10	Proteína filtrada de cultura de 10 kDa
CL	Cardiolipina
CSC	Controle sadio contactante
CSNC	Controle sadio não-contactante
DAT	Diaciltrealose

DO	Densidade óptica
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ESAT-6	Alvo antigênico secretório precoce de 6 kDa
ESPC	Proteína Autotransportadora Secretada por <i>Escherichia coli</i>
Esp	Especificidade
FCgR1A	Receptor Fc de imunoglobulina gama I
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GC	Centro Germinativo
HEOM	Hospital Especializado Octávio Mangabeira
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IGRA	Teste de Liberação do Interferon-gama
IC	Intervalo de confiança
IL-4	Interleucina 4
ILTB	Infecção latente de tuberculose
IR	Índice de reatividade
K	Índice Kappa
LAM	Lipoarabinomanana
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
Man-LAM	Lipoarabinomanano capeado por manose
MmpL	Proteína grande de membrana micobacteriana
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ODR	Razão de chances OR

OMS	Organização Mundial da Saúde
ODP	Outras Doenças Pulmonares
PAT	Ptiocerol dimicocerato
PDIM	Fitiocerol dimicocerato
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PIM2	Dimanósido de fosfo-mio-inositol
PIM6	Fosfo-mio-inositol-hexamanósido
PG	Peptideoglicano
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PPD	Derivado protéico purificado
PPE68	Imunomodulador da família PPE
PTC	Fosfatidilcolina
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor
RV	Razão de verossimilhança
SR	Sintomático respiratório
TB	Tuberculose
TBA	Tuberculose ativa
TBL	Tuberculose latente
TC	Tomografia computadorizada
Th2	Linfócitos T auxiliares 2
TDM	Dimicolato de trealose
TMA	Transcrição Mediada por Amplificação
TMB	Tetrametilbenzidina

TNF	Fator de Necrose Tumoral
TR-4	Receptor Testicular 4
TST	Teste da Tuberculina Cutânea
UF	Unidade Federada
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de cadeia da polimerase
RIF	Rifampicina
Sen	Sensibilidade
SOC3	Supressor de Sinalização de Citocinas 3
SL	Sulfolipídio
SL-1	Sulfolipídio 1
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
WT	Cepa selvagem de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Δ mce1	Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante no operon mce1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 TUBERCULOSE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGIA	16
1.2 TESTES DISPONÍVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA E LATENTE.....	19
1.3 RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
1.4 DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NA TUBERCULOSE	22
1.5 AVALIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS PARA O DIAGNÓSTICO DA	24
TUBERCULOSE.....	24
1.6 RESPOSTA IMUNE AOS LIPÍDIOS DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> E O OPERON MCE1.....	25
2 JUSTIFICATIVA.....	29
2.1 HIPÓTESE	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 DESENHO DO ESTUDO	31
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E LOCAL DE ESTUDO	32
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO	32
4.4 ENSAIOS LABORATORIAIS.....	33
4.4.1 Obtenção dos lipídios do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e preparo da solução estoque.....	33
4.4.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de imunoglobulinas anti lipídios.....	33
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
5 RESULTADOS	36

6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLOGIA

Tuberculose (TB), doença negligenciada que representa um grave problema para a saúde pública, é a principal causa de óbito por doenças infecciosas em todo mundo. Até a pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), a TB era a principal causa de óbito por um único agente infeccioso, superando até mesmo o vírus da imunodeficiência humana (HIV)/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (WHO, 2021). TB é uma doença crônica infectocontagiosa transmitida pelo ar e é causada por microrganismos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (PAI et al., 2016). A doença afeta tipicamente os pulmões (TB pulmonar), mas também pode atingir outros órgãos (TB extrapulmonar). As pessoas infectadas têm um risco vitalício de 5–10% de adoecer com TB e pessoas imunocomprometidas (como aquelas que vivem com HIV, desnutrição ou diabetes) têm esse risco ainda maior (WHO, 2021).

Estima-se que um quarto da população mundial (cerca de 1,7 bilhões de pessoas) está infectada pelo bacilo (WHO, 2021), sendo que 10% do total desses indivíduos pode progredir para a doença ativa, principalmente, nos dois primeiros anos após a infecção (GLICKMAN et al., 2001), os outros 90% conseguem conter o bacilo permanecendo assintomáticos. Por muito tempo acreditava-se que o indivíduo infectado pelo Mtb poderia desenvolver dois estados da infecção: a infecção latente de TB (ILTB) ou a doença ativa. Porém, estudos de patogênese em modelos animais e em humanos sugerem um curso mais complexo, onde, após contato inicial entre Mtb e um hospedeiro humano, o patógeno pode progredir para a TB ativa ou ser completamente eliminado por meio da resposta imune inata e/ou adquirida (PAI et al., 2016). Para indivíduos com ILTB, o hospedeiro mantém uma relação dinâmica com o Mtb através da regulação de nutrientes disponíveis bem como os sistemas imunológicos inatos e adquiridos (BARRY et al., 2009; SCHWANDER, DHEDA, 2011). Diante do elucidado, recentemente foi descrito um novo espectro da infecção pelo Mtb com fases adicionais que podem ser definidas entre a infecção latente e a reativação para a tuberculose ativa (ACHKAR, JENNY-AVITAL, 2011).

DRAIN e colaboradores (2018), fazem a descrição de dois estados clínicos adicionais na reativação da TB, denominados de TB incipiente e subclínica (Figura 1). O indivíduo com ILTB progride inicialmente para o estado conhecido como TB incipiente, que é uma fase da

infecção a qual apresenta Mtb viável, mas ainda não há a presença de sintomas clínicos, anormalidades radiográficas ou evidências microbiológicas consistentes com TB ativa. Em seguida desenvolve-se a TB subclínica, que é uma doença causada por Mtb viável, não apresenta sintomas clínicos relacionados à doença, mas causa outras anormalidades que podem ser detectadas usando ensaios radiológicos ou microbiológicos existentes. Por fim, acontece o desenvolvimento da TB ativa que é uma doença causada por Mtb viável que causa sinais e sintomas clássicos (como tosse persistente, febre vespertina, emagrecimento e sudorese noturna), além de apresentar anormalidades radiográficas ou evidências microbiológicas consistentes.

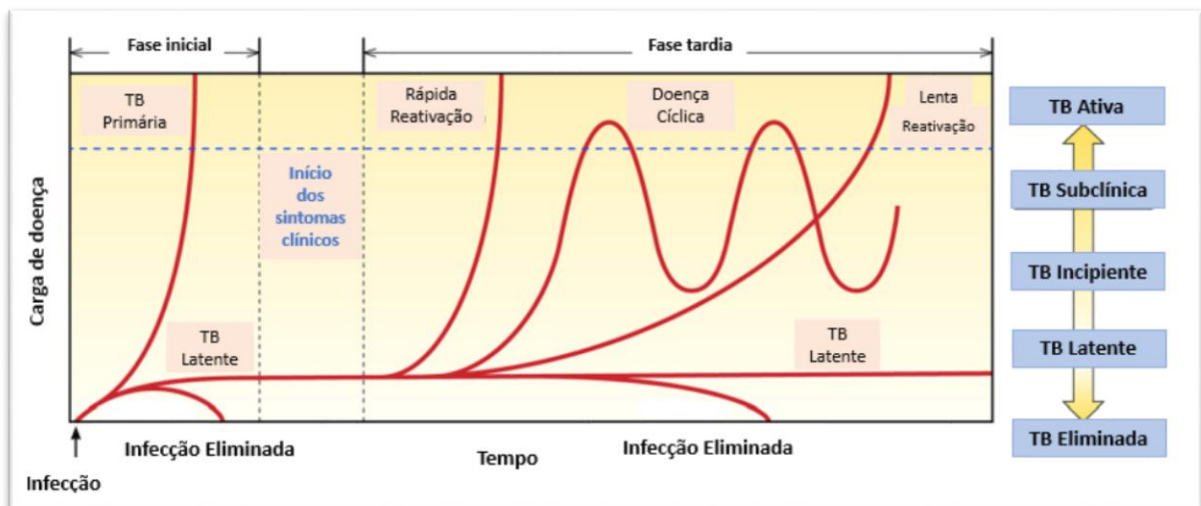


Figura 1- Vias de Progressão da tuberculose

Fonte: (Adaptado de DRAIN, et al., 2018).

Em 2020, estimou-se que cerca de 10 milhões de indivíduos desenvolveram TB no mundo, o que equivale a 127 casos por 100 mil habitantes. A maioria dos casos da doença ocorreu na Ásia (43%), África (25%), Américas (3,0%) e Europa (2,3%). Os 30 países com maiores prevalências de TB foram responsáveis por 86% de todos os casos incidentes em todo o mundo (Figura 2) (WHO, 2021).



Figura 2 - Incidência de TB nos países que notificaram, pelo menos, 100.000 casos em 2020.
Fonte: (Adaptado de WHO, 2021).

O Brasil está entre os 30 países de alta carga para TB e TB-HIV que são considerados prioritários pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o controle da doença no mundo. Quanto ao número de notificações de TB por Unidade Federada (UF), evidenciou-se uma importante heterogeneidade no país em 2021, observando-se que 11 UF tiveram coeficientes de incidência maiores que o coeficiente do Brasil (32,0 casos de TB por 100 mil hab.), sendo os maiores coeficientes registrados nos estados do Amazonas (71,3), Rio de Janeiro (67,4) e Roraima (54,6), seguidos do Acre (50,3), Pernambuco (45,9), Pará (42,6), Rio Grande do Sul (36,5), Mato Grosso do Sul (34,9), Espírito Santo (34,7), Amapá (35,2) e São Paulo (33,8), conforme demonstram a Figura 3. Na Bahia, foram notificados cerca de 25,3 casos de TB por 100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

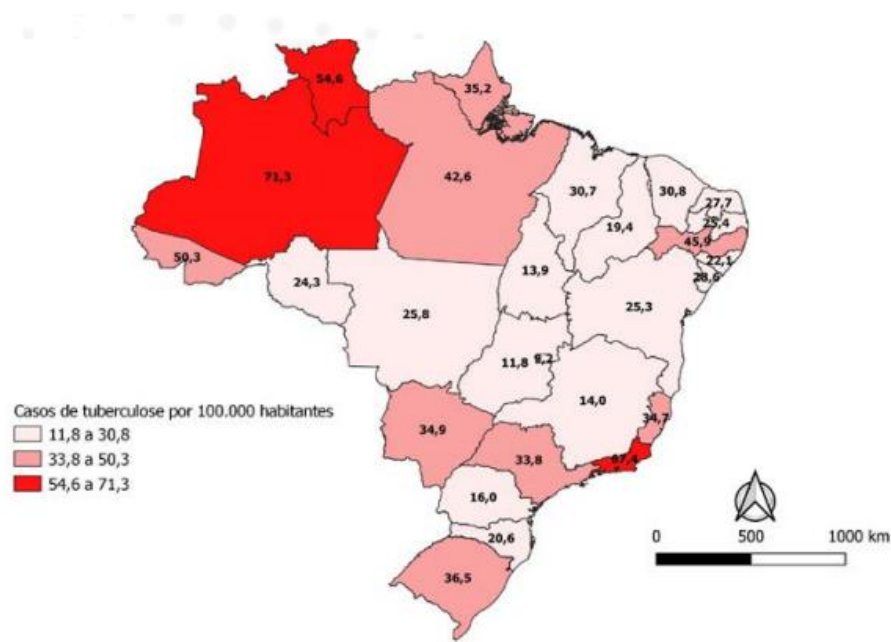


Figura 3 - Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.). Unidade Federada, 2021. Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Fonte: (BRASIL, 2021).

1.2 TESTES DISPONÍVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA E LATENTE

O diagnóstico da TB, embora tenha sido aperfeiçoado com o passar dos anos, ainda é um desafio nos postos de atendimento, principalmente nas fases as quais o paciente apresenta TB incipiente ou subclínica. Durante a transição da doença, embora o paciente já seja capaz de transmitir o Mtb, a ausência de sintomas evidentes da TB não é suficiente para que ele procure atendimento médico, o que impõe ao sistema público de saúde um desafio ainda maior para controlar a doença. Não existem até o momento testes diagnósticos capazes de identificar a transição entre infecção-doença antes da manifestação dos sintomas respiratórios. Devido à alta taxa de incidência da doença e o aumento no número dos casos de resistência às drogas disponíveis comercialmente, a OMS tem alertado quanto a necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos e de fácil execução, com alta sensibilidade e especificidade e que não dependam da utilização de amostras de escarro, em decorrência da sua dificuldade de obtenção.

A baciloscopia do escarro é considerada a técnica primária empregada para o diagnóstico da TB, desde que executada corretamente em todas as suas fases, permite detectar

de 60% a 80% dos casos de TB pulmonar em adultos (BRASIL, 2019). Entretanto, é considerado um teste com baixa sensibilidade e com um baixo limite de detecção (5.000-10.000 bacilos por mililitro de expectoração) (WHO, 2021). O método que é considerado padrão-ouro para a confirmação bacteriológica da TB é a cultura, que apresenta elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% a sensibilidade do diagnóstico bacteriológico da doença (BRASIL, 2019). Contudo, apesar de ser o melhor e mais sensível teste para confirmação da doença, há uma demora para obtenção do resultado (em média 1-3 semanas), o que dificulta o rápido diagnóstico da doença (WHO, 2021).

Nos últimos anos, numerosos métodos de biologia molecular foram desenvolvidos para o diagnóstico da TB, incluindo a utilização de sondas de ácidos nucleicos e técnicas de amplificação de genes como: a reação de cadeia da polimerase (PCR), amplificação de deslocamento de fita (ADF), transcrição mediada por amplificação (TMA), dentre outros (ACHARYA et al., 2020). O ensaio GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Califórnia) é o teste molecular que tem sido amplamente utilizado. Esse é considerado um teste rápido computadorizado, que permite a detecção de DNA de *Mtb* e sua resistência à rifampicina diretamente no escarro em 2 horas (THERON et al., 2012). Entretanto, a utilização dessa técnica requer uma infraestrutura sofisticada e uma equipe capacitada para a sua realização, o que dificulta o amplo uso em países de baixa renda e baixo investimento na área de saúde, e que apresentam as maiores incidências da doença.

Alguns testes imunológicos são utilizados, principalmente, para a triagem da doença, como o teste da tuberculina cutânea (TST) e o teste de liberação do interferon-gama (IGRA). O TST, também conhecido como Mantoux, é baseado na injeção intradérmica de derivado proteico purificado (PPD) do *Mtb* para detectar a resposta imunológica do indivíduo a partir do tamanho de reação na região de aplicação (≥ 5 mm é considerado positivo), após 48 a 72 horas. Embora esse teste apresente um bom desempenho em detectar a exposição ao *Mtb* nos países onde a doença é menos prevalente, a eficácia do TST é limitada nos países com alta prevalência da TB, apresenta resultados falsos positivos em indivíduos que foram vacinados com o Bacille Calmette-Guerin (BCG) ou que foram infectados por micobactérias não tuberculosas (MNT) (LATORRE et al., 2010). Ademais, a sensibilidade do TST é muito baixa em indivíduos imunocomprometidos (CLINIC; MISNER, 2018).

Os testes IGRAs são utilizados para o diagnóstico da TBL e foram desenvolvidos para superar as limitações associadas ao TST (PAI; RILEY; JR, 2004). O teste baseia-se na

quantificação de interferon-gamma (IFN- γ) através de imunoensaio enzimático e após a cultura de sangue total com antígenos do Mtb. Dentre os antígenos utilizados encontram-se o ESAT-6 e o CFP-10, os quais são ausentes na vacina da BCG e nas MNTs mais comuns. O controle negativo do teste não apresenta antígenos do Mtb, enquanto o controle positivo usa fitohemaglutinina como antígeno não específico (MICHELLE K. HAAS et al., 2019). Não existe um teste padrão ouro para o diagnóstico da TBL, contudo o IGRA é considerado o melhor teste existente para identificação dessa condição clínica.

Além dos testes citados anteriormente, o diagnóstico por imagem é uma importante ferramenta para acompanhamento da TB pulmonar e confirmação da doença. Na radiografia do tórax podem ser observados vários padrões radiológicos sugestivos de atividade de doença, como cavidades, nódulos, consolidações, massas, processo intersticial (miliar), derrame pleural e alargamento de mediastino. A tomografia computadorizada (TC) do tórax é mais sensível para detectar alterações anatômicas dos órgãos ou tecidos comprometidos e é indicada na suspeita de TB pulmonar quando a radiografia inicial é normal, e para o diagnóstico diferencial de outras doenças torácicas, especialmente em pacientes imunossuprimidos (BOMBARDA et al., 2019).

1.3 RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO *Mycobacterium tuberculosis*

Dados experimentais evidenciaram que a imunidade humoral pode contribuir na defesa contra patógenos que tenham preferência por vida intracelular (CASADEVALL, 2003; CASADEVALL; PIROFSKI, 2012), incluindo também possível proteção contra o Mtb (GLATMAN-FREEDMAN, 2006; CASADEVALL, 2003; CHAN et al., 2014).

Já foi identificado uma alta regulação do receptor de anticorpo de alta afinidade FCgR1A, em estudos que analisaram transcritos de sangue total de pacientes com tuberculose ativa (CLIFF et al., 2013; KAFOROU et al., 2013; PETRILLI et al., 2020). Esse receptor liga-se, principalmente, à anticorpos dos subtipos IgG1 e IgG3, expressos em macrófagos e células dendríticas (GUILLIAMS et al., 2014). A ativação de C1q, integrante do sistema complemento, que forma imunocomplexos com imunoglobulinas, estão também elevados na doença tuberculosa ativa indicando uma associação com a severidade da doença (CLIFF et al., 2013; CAI et al., 2014; PETRILLI et al., 2020). Outros componentes que podem estimular a imunidade humoral também estão presentes no local da infecção: no trabalho de Ashenafi et al., 2014, identificou-se que na TB pulmonar há aumento de citocinas do tipo Th2 como IL-4, CCL-4 e SOCS3 no lavado bronquioalveolar o que pode estar estimulando a resposta por

anticorpos. A expressão da citocina SOCS3 também foi identificada com alta sensibilidade e especificidade no estudo de Petrilli e colaboradores, em 2020.

Adicionalmente, outros estudos ressaltaram que a produção de anticorpos auxilia no combate à infecção pelo Mtb. Em sistemas experimentais, camundongos infectados por via aérea e que não secretam anticorpos, tiveram uma capacidade diminuída de controle da infecção pelo Mtb e uma maior letalidade (FOUNTAIN et al., 2013). Evidências acumuladas, na última década, revelaram que a administração de anticorpos monoclonais contra vários componentes do Mtb, tais como arabinomanana, lipoarabinomana (LAM), heparina hemaglutinina e a proteína 16 kDa podem proteger camundongos contra o bacilo da TB (HAMASUR et al., 2004; PETHE et al., 2001; RELJIC; CLARK; WILLIAMS, 2006), se for levado em consideração os parâmetros de carga bacteriana, extensão da disseminação e inflamação local (GLATMAN-FREEDMAN, 2006). Esses resultados demonstram que a imunidade humoral, com consequente produção de anticorpos, tem papel importante no contexto da infecção pelo Mtb.

1.4 DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NA TUBERCULOSE

Células B apresentam múltiplas funções. As mais conhecidas se diferenciam em plasmócitos de forma dependente, ou não de células T, podem ser regulatórias, possuem a habilidade de apresentar antígenos e produzir citocinas (LUND; RANDALL, 2010). A interação entre células B e T CD4 auxiliares resulta na expansão de células B, hipermutação somática, maturação de afinidade, mudança de classe e o desenvolvimento de células B de memória e plasmáticas produtoras de anticorpos (Figura 4) (CHAN et al., 2014).

Com base na localização, isotipo do receptor e função específica, as células B de memória podem residir no tecido ou serem encontradas no sangue periférico (INOUE et al., 2018). O estudo de Du Plessis et al., 2016, identificou que células B de memória CD27+ IgM+ são encontradas no sangue periférico de pacientes com tuberculose ativa. A diferenciação dessas células caracteriza-se pela maturação na afinidade e mudança de isotipo de receptores, tornando-as ativadas nos centros germinativos (CG) dos linfonodos, local onde a maioria dessas células ainda expressa IgM de baixa afinidade com alguma mudança de isotipo para células B IgG+ ou IgA+ de memória (TAYLOR; PAPE; JENKINS, 2012). Uma vez que as células B de memória são expostas novamente aos antígenos, elas podem se transformar em células do plasma secretoras de anticorpos ou voltar ao CG. Essa última opção permite a mudança de classe e maturação de afinidade, aumentando a diversidade das células B de memória (INOUE

et al., 2018; STEBEGG et al., 2018).

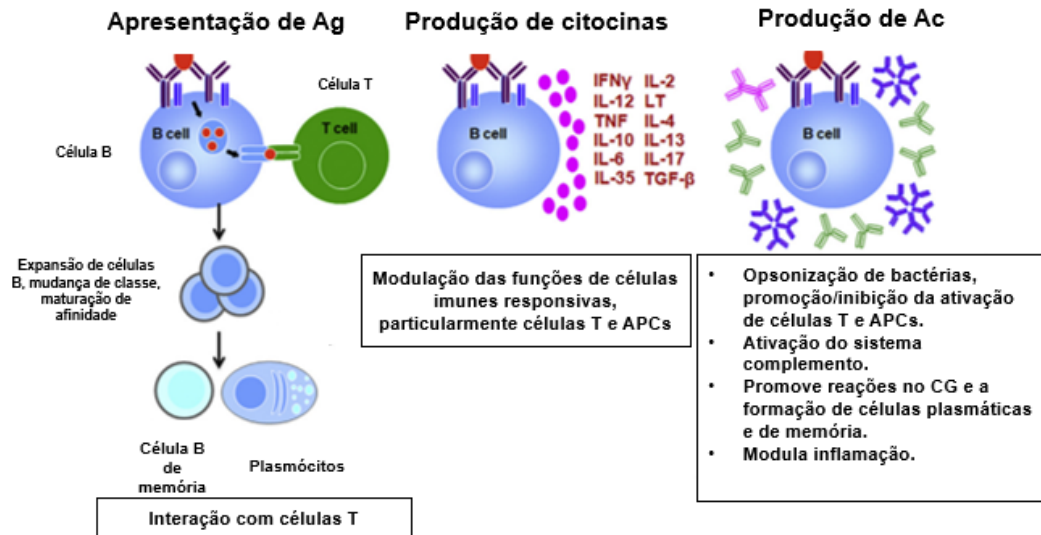


Figura 4 - Mecanismos pelos quais as células B moldam a resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis*. As células B podem regular a resposta do hospedeiro ao Mtb: (1) funcionando como antígeno apresentando células para interagir com células T: o local primário desta reação é no centro germinativo (CG). A interação entre as células B e Tf (células T auxiliares foliculares) culmina na expansão de células B, hipermutação somática, maturação de afinidade, mudança de classe e o desenvolvimento de células B de memória e células plasmáticas produtoras de anticorpos; (2) produção de citocinas que modulam células imunes responsivas, inclusive influenciando a diferenciação de células T e, portanto, suas funções efetoras; e (3) produção de anticorpos (Ac) que podem modular múltiplos aspectos da resposta imune inata e adaptativa. Anticorpos específicos de Mtb podem opsonizar bacilos extracelulares, formar complexo imunológico que fixa complementos e engaja os receptores Fc das células efetoras, modulando assim suas funções e, portanto, seus efeitos em outras células imunes, incluindo células T. Os anticorpos também podem modular as reações do CG, assim como a inflamação em tecidos infectados. LT: linfotóxica; TGF: fator transformador de crescimento; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; APC: célula apresentadora de antígeno; CG: centro germinativo; Ac: anticorpos; Ag: Antígeno; Círculo vermelho: antígeno de Mtb; Círculos rosa: citocinas secretadas; Verde Y: IgG; Rosa duplo Y: IgA dimérica; Floco de neve azul: IgM pentamérica; marrom duplo Y: receptor de células B

Fonte: (Adaptado de CHAN et al., 2014).

O desenvolvimento de granuloma é um marcador da infecção pelo Mtb (ORME; BASARABA, 2014). Granulomas no pulmão de humanos contêm agregados de células B ainda não sensibilizadas, de memória e células plasmáticas como eosinófilos, neutrófilo, macrófagos e células T CD4+ e CD8+ (LASCO et al., 2004; ULRICHS et al., 2004; ACHKAR; CHAN; CASADEVALL, 2015 ; BOHRER et al., 2021). A interação celular dentro dos granulomas com os antígenos do Mtb facilita a exposição e ativação de células B com consequente produção de anticorpos. Subpopulações de células B são consideradas a fonte primária de IgM que

reconhecem antígenos micobacterianos (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010; BAUMGARTH, 2010; CERUTTI; PUGA, 2013).

Anticorpos específicos contra o Mtb podem opsonizar bacilos extracelulares ativando complementos através dos receptores Fc das células efectoras, modulando assim suas funções e efeitos em outras células imunes, incluindo células T. Anticorpos também podem modular as reações do centro germinativo e a inflamação nos tecidos infectados (CHAN et al., 2014). Em um estudo recente, identificou-se que anticorpos monoclonais humanos dos isotipos IgM e IgG, no soro de pacientes infectados, contra o lipídio lipoarabinomanan (LAM) do Mtb foram gerados a partir de células B de memória (CHOUDHARY et al., 2018). Esses dados indicam que a produção de IgG e IgM é importante para o controle da infecção pelo Mtb e abre a perspectiva de que essas moléculas possam ser avaliadas como ferramentas e para o desenvolvimento de testes rápidos para diagnóstico da TB.

1.5 AVALIAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

As evidências de que a produção de imunoglobulinas é importante para o controle de diversas infecções, incluindo patógenos intracelulares como o Mtb, abre perspectiva para avaliar se a produção dessas moléculas seria útil para a identificação de possíveis marcadores sorológicos de gravidade de doença, de progressão da infecção latente para a doença ativa e para o diagnóstico da TB. Ensaio imunoenzimáticos para quantificação de imunoglobulinas são considerados métodos de simples execução, econômicos e minimamente invasivos, além de dispensar a coleta de escarro, que é de difícil obtenção, principalmente, em crianças e idosos.

Na última década, alguns estudos avaliaram antígenos proteicos do Mtb como alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos sorológicos para TB. No estudo de Ben Selma et al., 2010, identificou-se que o uso clínico do ensaio sorodiagnóstico IgG baseado na detecção do antígeno A60 do Mtb é de grande valor para o rápido diagnóstico e discriminação entre TB ativa e doenças pulmonares não-TB. Mais tarde no estudo de Xu; Chen; Chen, 2012, observou-se que a fusão de proteínas do Mtb como a proteína CFP-10, ESAT-6 e o domínio de fragmento extracelular PPE68 poderiam ser utilizados no soro diagnóstico da TB ativa. O estudo de Zhang et al., 2013 mostrou que o uso clínico dos antígenos proteicos ESAT-6, CFP-10, ESAT-6/14KD/38KD e os antígenos ESAT 6/14KD/38KD para sorodiagnóstico mediado por IgG, apresenta valor significativo para o diagnóstico rápido de TB e para a discriminação entre pacientes com TB ativa e controles. Em um estudo recente, foi avaliado o potencial de 17

proteínas específicas do Mtb para a detecção de antígenos específicos para o diagnóstico da TB por IgG e IgM. Entre esses candidatos, os antígenos Rv0220 e Rv1987 em combinação ao Rv3807 foram considerados os mais promissores (MA et al., 2020).

A detecção de anticorpos específicos do Mtb é um método considerado mais rápido e simples de executar do que a maioria dos métodos baseados em amostras de escarro e células T (SILVA et al., 2003; P ANDERSEN et al., 2000). Contudo, a OMS não aprovou testes sorológicos baseados na detecção de proteínas de Mtb devido sua baixa sensibilidade e especificidade (WHO, 2011). Se os componentes proteicos do Mtb testados não são bons na indução de anticorpos específicos úteis para serem aplicados no diagnóstico, outras moléculas importantes para a virulência do bacilo devem ser avaliadas.

1.6 RESPOSTA IMUNE AOS LIPÍDIOS DO *Mycobacterium tuberculosis* E O OPERON MCE1

A parede celular do Mtb contém diversas classes de lipídios. Cerca de 40% do peso seco da parede celular dessa bactéria é constituído por essas moléculas (ANDERSON, 1943) (Figura 5). Lipídios de galactomanano, lipomanano, dimicocerosato de ftiocerol, dimicolil trealose (fator de corda), sulfolipídios específicos para o Mtb e os manosídeos de fosfatidilinositol (HETT et al., 2008), são alguns dos lipídios presentes que podem estimular células B na produção de imunoglobulinas (CHAN et al., 2014).

Sabe-se que o Mtb contém quatro cópias homólogas de um operon *mce1-4*, possivelmente envolvidos no transporte de lipídios através da parede celular do bacilo (COLE et al., 1998; CASALI; RILEY, 2007). Em um estudo foi observado que a interrupção do operon *mce1* interferiu na formação de uma resposta celular do tipo Th1, a qual comprometeu a formação de granulomas organizados nos pulmões de camundongos (SHIMONO et al., 2003). A expressão do operon *mce1* é reprimida na cepa selvagem (WT) do Mtb nas primeiras oito semanas de infecção em camundongos (UCHIDA et al., 2007) e sua expressão diminui após 4h de infecção em macrófagos (CASALI; WHITE; RILEY, 2006). Dessa forma, em algum momento durante a infecção *in vitro* de macrófagos ou *in vivo* (em camundongos), a cepa WT apresenta o mesmo fenótipo da cepa mutante no operon *mce1* ($\Delta mce1$).

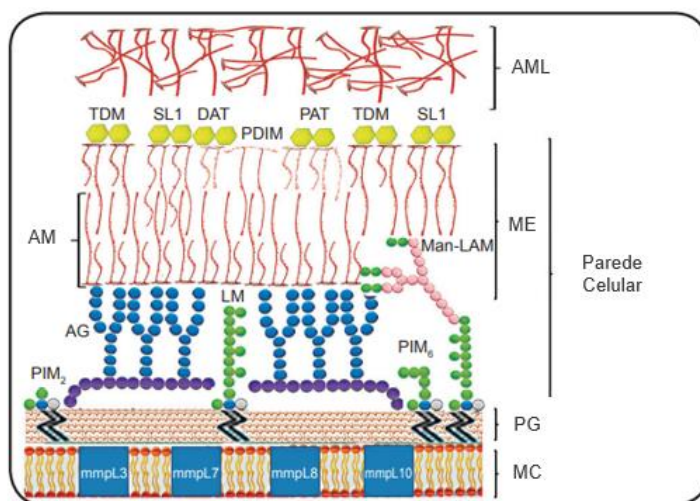


Figura 5 - Representação esquemática do envelope celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Os componentes incluem MC, PG e ligações covalentes a macromoléculas: AG, PIM₂, PIM₆, LM e Man-LAM; um composto ME de AM ligado covalentemente a AG, TDM, DAT, PAT, PDIM e SL-1; e uma camada mais externa de AML; AML: ácido micólico livre; TDM: dimicolato de trealose; SL-1: sulfoglicolípido; DAT: diaciltrealose; PDIM: ftiocerol dimicocerosato; PAT: poliactiltrealose; AM: ácido micólico; Man-LAM: lipoarabinomanano capeado por manose; ME: membrana externa; AG: arabinogalactano; LM: lipomanana; PIM₂: dimanósido de fosfo-mio-inositol; PIM₆: fosfo-mio-inositol-hexamanósido; PG: peptidoglicano; MC: membrana celular; mmpL: proteína de membrana micobacteriana grande.

Fonte: (Adaptado de QUEIROZ; RILEY, 2017).

A repressão do operon *mce1* causa modificação da composição lipídica de sua parede celular, com acúmulo de ácidos micólicos (AM) livres (CANTRELL et al., 2013; QUEIROZ et al., 2015). No estudo de Queiroz e colaboradores em 2015, foi identificado, por análises de metabolômica de lipídios, que a cepa $\Delta mce1$ contém quantidades reduzidas de diaciltrealose, fosfatidiletanolamina, sulfoglicolípido diacilado, ácido phitienoico e ácido phiticerânico em sua parede celular, em comparação com seu parental WT. Nesse mesmo estudo, a análise de lipidômica demonstrou a expressão diferencial de mais de 400 espécies lipídicas entre a cepa $\Delta mce1$ e a cepa WT. Queiroz e Riley em 2017, propuseram um modelo de “*imunostato mycobacteriano*” no qual o Mtb, a partir da regulação dos lipídios da parede celular, controlaria a resposta imune do hospedeiro. Muitos desses lipídios estão associados a uma resposta imune distinta no hospedeiro durante a primeira fase de infecção, a diferença na expressão desses determinará se o bacilo entrará, ou não, na fase crônica da infecção. Esse processo pode estar associado à persistência da bactéria no hospedeiro.

A resposta imune aos lipídios do Mtb no hospedeiro tem sido avaliada. Já foi identificado a capacidade desses em induzir a formação de granuloma (BEKIERKUNST et al., 1969), migração de leucócitos (BLOCH, 1949), expressão de citocinas inflamatórias (GILLERON et

al., 2004) ou a inibição da resposta de macrófagos (PABST et al., 1988). Em um trabalho recente, foi avaliado a resposta aos lipídios da cepa WT e $\Delta mce1$ em macrófagos murinos e em subpopulações de células T humanas, com o objetivo de avaliar como as mudanças na composição lipídica da parede do Mtb podem modular a resposta imune do hospedeiro (PETRILLI et al., 2020). Nesse estudo, identificou-se que os lipídios da cepa $\Delta mce1$, em relação à WT, aumentam a expressão de mRNA de receptores nucleares ativados por lipídios como o TR4 (Receptor Testicular 4) e PPAR- γ (Receptor Ativado por proliferadores de peroxissoma) e diminuem a expressão dos genes que codificam as citocinas TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IL-6 (Interleucina 6) e IL-1 β (Interleucina 1 beta), em macrófagos. Além disso, os dados sugerem que as mudanças na expressão do operon *mce1* durante o curso da infecção podem servir como uma estratégia do Mtb para escapar das respostas pró-inflamatórias do hospedeiro.

A observação de que os lipídios do Mtb induzem uma resposta imune celular no hospedeiro nos levou a avaliar se os extratos lipídicos das cepas de Mtb WT e $\Delta mce1$ seriam capazes também de estimular a produção de anticorpos séricos em indivíduos com TB ativa e latente. Se sim, a síntese de anticorpos nessa população poderia ser avaliada como possíveis marcadores sorológicos para o diagnóstico da TB ou para monitorar a progressão da doença. Estudos prévios avaliaram e quantificaram imunoglobulinas G e M em resposta a alguns lipídios do Mtb. No estudo de Goodridge, et al., em 2012, analisou-se os níveis de IgM anti-fosfolipídios presentes no Mtb, incluindo cardiolipina (CL), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PTC) e esfingolipídeo (SL), com o objetivo de encontrar biomarcadores para a resposta ao tratamento em pacientes com TB e com baciloscopia positiva. Neste estudo, encontraram que IgM contra lipídios micobacterianos são potenciais biomarcadores para monitorar o tratamento da TB em adultos (GOODRIDGE et al., 2012; TOGUN et al., 2018). Em outro estudo, Takenami e colaboradores em 2018, avaliaram a resposta de IgG e IgM séricas contra cardiolipina (CL), fosfatidilcolina (PTC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e sulfatida (SL-I), com o objetivo de obter bioassinaturas que poderiam ser usadas para o diagnóstico da TB e avaliar sua aplicabilidade no monitoramento da eficácia do tratamento anti-tuberculose. Um estudo recente avaliou os níveis séricos de imunoglobulinas contra antígenos do envelope celular do Mtb (como cardiolipina, sulfato, ácido micólico e proteína Mce1A) para monitorar a resposta ao tratamento da TB em crianças e adolescentes com TB pulmonar ou extrapulmonar (DOS SANTOS et al., 2020). Essas análises mostraram que após seis meses de tratamento da doença houve uma

diminuição significativa dos níveis de IgM e IgG contra a proteína Mce1A.

Em conjunto, os estudos anteriores reforçam a importância de avaliar se a produção de IgG e IgM responsivos aos extratos lipídicos do Mtb pode ser útil para o desenvolvimento de testes para diagnóstico e prognóstico da TB.

2 JUSTIFICATIVA

Tuberculose é uma doença negligenciada que afeta cerca de 70.000 brasileiros a cada ano. É diagnosticada quando o paciente apresenta tosse crônica e perda de peso, que são sintomas tardios decorrentes da reativação do bacilo e destruição tecidual pulmonar. A transição entre a infecção latente e a doença tuberculosa ocorre progressivamente. Nas primeiras semanas de reativação bacilar, embora o paciente seja capaz de transmitir a doença, a falta de sintomas evidentes da TB os previne de procurar atendimento médico, o que impõe ao sistema público de saúde um desafio maior para controlar a doença. Mesmo na ausência dos sintomas que caracterizam a TB ativa, o indivíduo em fase de reativação já apresenta lesão tecidual avançada que resulta em tosse, causando transmissão do bacilo e infecção de outros indivíduos. Outro problema para o diagnóstico clínico é que existem doenças que apresentam sintomas semelhantes aos da TB pulmonar como tosse, perda de peso e febre, o que dificulta o rápido diagnóstico e o início imediato do tratamento. Os testes que existem atualmente para a triagem e diagnóstico da doença dependem da utilização de amostras de escarro que são consideradas, muitas vezes, de difícil obtenção, principalmente para crianças e idosos.

Ainda não existem testes diagnósticos capazes de identificar a transição entre infecção-doença, antes mesmo da manifestação dos sintomas respiratórios como a tosse, que contribui para a transmissão do bacilo para outros indivíduos. Uma alternativa a esses testes seria o desenvolvimento de testes sorológicos de simples execução, econômicos e minimamente invasivos. Diante desse cenário, o presente estudo pretende avaliar a presença de imunoglobulinas séricas capazes de reconhecer lipídios da cepa de Mtb selvagem e mutante no operon *mce1* e se há potencial dessas moléculas lipídicas serem usadas para identificação de possíveis biomarcadores séricos para o diagnóstico e prognóstico da TB prévia e reativação da infecção para doença ativa.

2.1 HIPÓTESE

A observação de que os lipídios do Mtb são importantes fatores de virulência com a indução da resposta em macrófagos e células T, traz evidências de que essas moléculas serão capazes de induzir uma resposta humoral com produção de IgG e IgM. Além disso, o indício de que o extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$ poderia estar associado com a TB latente, indica a possibilidade de que a produção de anticorpos aos dois extratos vai permitir distinguir a infecção de doença ativa, o que seria útil para o desenvolvimento de marcador de progressão.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de anticorpos séricos reativos aos antígenos lipídicos do *Mycobacterium tuberculosis* e o desempenho dos testes em diferenciar pacientes com tuberculose ativa (TB) e controles sadios contactantes (CSC), além de indivíduos com tuberculose latente (TBL), controles sadios não-contactantes (CSNC) e no soro de pacientes com outras doenças pulmonares (ODP).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I - Avaliar os níveis de anticorpos IgG e IgM anti lipídios da cepa selvagem do Mtb e o desempenho dos testes na distinção entre os grupos de pacientes e indivíduos incluídos no estudo.

II - Avaliar os níveis de anticorpos IgG e IgM anti lipídios da cepa $\Delta mce1$ do Mtb e o desempenho dos testes na distinção entre os grupos de pacientes e indivíduos incluídos no estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho preenche os critérios para um estudo tipo corte transversal (Figura 6).

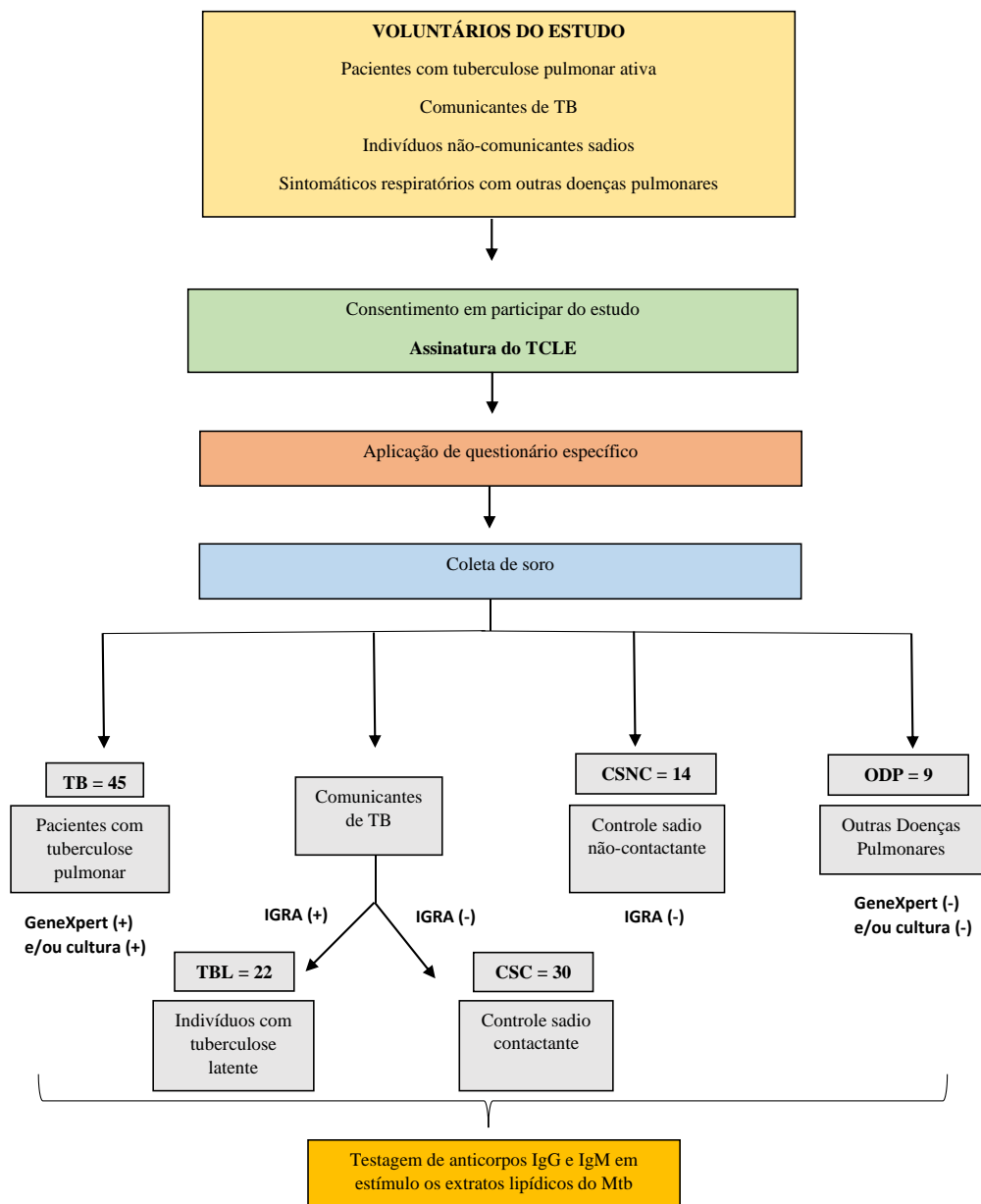


Figura 6 - Representação Experimental do Estudo. TCLE = Termo de consentimento livre e esclarecido. IGRA: Ensaio de liberação de interferon-gama. GeneXpert MTB/RIF = Teste rápido molecular para o diagnóstico da tuberculose pulmonar com resistência a rifampicina.

Fonte: Elaboração da autora.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E LOCAL DE ESTUDO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para pesquisa em seres humanos do Instituto Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ), Salvador, Bahia-Brasil (CAAE: 76009417.9.0000.0040). Voluntários com diagnóstico de TB ou ODP e contatos de pacientes com TB foram recrutados no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), Salvador, Bahia, Brasil. Voluntários não-contactantes foram recrutados entre indivíduos que frequentam ou trabalham no Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA. Todos os voluntários tinham entre 18 e 65 anos de idade. Consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

As amostras de soro dos voluntários do estudo foram coletadas e congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso. Esse estudo incluiu soro de 120 voluntários: 45 soros de indivíduos considerados testes com TB ativa e 44 soros de indivíduos controles, sendo 30 soros de indivíduos sadios contactantes de TB (CSC/ IGRA-) e 14 soros de indivíduos sadios não-contactantes de TB (CSNC/IGRA-), 22 eram soros de indivíduos contactantes com infecção latente por *Mtb* (TBL/IGRA+) e nove eram pacientes com outras doenças pulmonares (ODP). O diagnóstico de TB pulmonar ativa foi realizado pelo teste GeneXpert MTB/RIF e/ou cultura positiva. Amostras de soro foram coletadas antes do tratamento da TB. Os indivíduos contactantes domiciliares de pacientes com TB foram distribuídos entre os grupos TBL ou CSC com base no teste QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QTF-IT). Aqueles indivíduos contactantes com teste QTF-IT negativo (cutoff $\leq 0,35$ UI/mL) foram classificados como CSC saudáveis, enquanto os contatos domiciliares com resultado positivo (cutoff $> 0,35$ UI/mL) foram considerados indivíduos com TBL. Os não contactantes também foram avaliados com o teste QTF-IT e incluídos se negativos. O grupo com outras doenças pulmonares (ODP) eram pacientes com suspeita de TB pulmonar, mas com teste negativo para GeneXpert MTB/RIF, baciloscopia de escarro e cultura. Indivíduos que testaram positivo para HIV e pacientes em tratamento imunossupressor foram excluídos do estudo.

4.4 ENSAIOS LABORATORIAIS

4.4.1 **Obtenção dos lipídios do *Mycobacterium tuberculosis* e preparo da solução estoque**

A obtenção dos lipídios do Mtb foi realizada conforme modelo padronizado por Queiroz (2015). As cepas de Mtb Erdman selvagem e mutante no operon *mce1* foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 broth (Difco, MD) contendo 10% de ADC (Beckton-Dickinson, MD) e 0,2% de glicerol (Fisher Scientific, NJ) à 37°C até alcançar a fase estacionária. Depois disso, 300µL da cultura saturada foram cultivados em garrafas de cultura de 75cm² contendo 30 mL de meio 7H9 contendo 10% de ADC e 0,2% de glicerol, e incubados à 37°C e 5% de CO₂ por 19 dias para formação de cultura planquitônica. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 5 mL de metanol: 0,3% NaCl (100:10). A essa solução foram acrescentados 2,5 mL de éter de petróleo e homogeneizadas por 30 min em temperatura ambiente. A formação da camada superior composta por éter de petróleo e contendo os lipídios apolares foi acelerada mediante centrifugação e coletada para o preparo das soluções estoque. Ambos os extratos lipídicos foram estocados em uma concentração de 100 µg/mL de hexano:isopropanol (1:1) e armazenados a -80°C para sensibilizar as placas de ELISA.

4.4.2 **Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de imunoglobulinas anti lipídios**

Os imunoenaios enzimáticos indireto (ELISA indireto) foram realizados de acordo com Dos Santos et al., 2020, com algumas modificações. As soluções estoques dos extratos lipídicos de ambas as cepas foram diluídas em uma concentração de 1:1000 e, em seguida, 50 µl dessas soluções foram incubadas por 18 horas em microplacas de poliestireno de fundo plano (Greiner Bio-One, Alemanha). As placas foram bloqueadas com 100 µl da solução com a fração V de albumina de soro bovino (BSA) (Merk) a 3% + salina tamponada com fosfato (PBS) a 1X e lavadas duas vezes com solução de PBS 1X, pH 7,4. As amostras de soro foram diluídas 1:100 em 3% BSA + PBS 1X. Os soros diluídos foram adicionados às placas e incubados à temperatura ambiente durante 1 hora. Depois de lavar três vezes com PBS 1X, anticorpos anti IgM humano (HRP) (1:10.000) ou anti-IgG humano (HRP) (1:50.000) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram diluídos em 3% BSA + PBS 1X e 100 µl foram adicionados aos poços e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS 1X e depois foram adicionados 100 µl de solução de tetrametilbenzidina (TMB) (Invitrogen Life

Technologies, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com 100 µl de ácido sulfúrico 1- 2 M (Pershy Química, Brasil). A absorbância foi medida pela densidade óptica (DO) a 450 nm em um leitor de ELISA (Multiskan FC Thermo). Os resultados foram expressos como a média dos valores das amostras em triplicata para cada antígeno menos a média dos valores dos poços em triplicata do branco (excluindo soro); o coeficiente de variação foi considerado < 10%.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade do conjunto de dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez que o teste identificou uma distribuição não paramétrica, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelas múltiplas comparações do teste de Dunn's para avaliar a diferença estatística entre os grupos. A dispersão da dosagem de IgG e IgM de cada grupo foi avaliada pela mediana e intervalo interquartil (IQ). Para a avaliação do desempenho dos extratos lipídios do Mtb pelo teste de ELISA, as variáveis contínuas foram expressas como médias geométricas \pm desvios padrões da média. Para os cálculos, utilizou-se o programa Prisma GraphPad versão 8, Sna Diego CA, US). Nível de significância foi estabelecido em 5% para todos os testes estatísticos (valores de P de 0,05). A análise do ponto de corte foi usada para determinar o valor da DO ideal para discriminar entre amostras negativas e positivas. O valor limite foi determinado calculando a área sob a curva característica de operação do receptor (ROC) (AUC). Os valores de AUC também foram usados para avaliar a precisão global para cada antígeno, que pode ser classificado como baixo (0,51 a 0,61), moderado (0,62 a 0,81), elevado (0,82 a 0,99) ou excelente (1,0) (SWETS, 1988). Os resultados foram expressos como um índice que representa a razão entre a DO das amostras e a DO do ponto de corte. Esse índice é chamado de índice de reatividade (IR) e todos os resultados >1,00 foram considerados positivos. As amostras foram consideradas inconclusivas (ou na zona cinzenta) se os valores de IR caíram na zona indeterminada, que foi assumido como valores de $1,0 \pm 10\%$. Os parâmetros de desempenho dos lipídios antigênicos WT e $\Delta mce1$ foram determinados usando uma abordagem dicotômica (tabela de dupla entrada) e comparados em termos de sensibilidade, especificidade, acurácia, razões de verossimilhança e razão de chances de diagnóstico (ODR), com TB representando o grupo positivo e CSC o grupo negativo. Foram utilizados ICs com nível de confiança de 95%. A análise estatística dos IRs foi realizada com base na ausência de sobreposição de IC de 95%. A avaliação da imprecisão foi baseada no coeficiente Kappa de Cohen, que foi interpretado da seguinte forma: ruim ($\kappa < 0,00$), leve (0,00 – 0,20), regular (0,21

– 0,40), moderado (0,41 – 0,60), substancial (0,61 – 0,80) ou quase perfeito (0,81 – 1,00) (LANDIS; KOCH, 1977).

5 RESULTADOS

Um total de 120 amostras de soro humano foram incluídas no estudo. A Tabela 1 sumariza os dados clínicos e demográficos dos voluntários e pacientes incluídos. Não houve diferença estatística das características avaliadas entre os grupos, como idade ($p = 0,0812$) e vacinação com BCG ($p = 0,2078$). A média geral de idade dos grupos incluídos no estudo foi 38 anos e a razão entre gêneros feminino/masculino foi 1,3. O gênero feminino representou 55% da população do estudo, enquanto o masculino 44%. Apesar do recrutamento ter sido realizado por livre demanda, houve um maior número de indivíduos do sexo masculino no grupo TB e feminino no grupo de voluntários com TBL e CSNC ($p = 0,0275$).

Todos os pacientes com TB foram selecionados com base no resultado positivo do teste GeneXpert MTB/RIF (100%) e/ou cultura positiva (53%). Culturas que foram coletadas após o início do tratamento foram definidas como não informado, e representam 46% da população com TB. Os pacientes cujo cultivo de escarro foi positivo (53%), tiveram suas amostras coletadas no momento inicial do diagnóstico. Dos 45 pacientes com TB, 29 (64%) apresentaram resultado positivo na baciloscopia do escarro (BAAR), outros 11 (24%) não realizaram o exame e cinco pacientes (11%) apresentaram resultado negativo. Os voluntários que foram incluídos como ODP são pacientes sintomáticos respiratórios (SR) que apresentavam sintomas clínicos semelhantes à TB, mas que testaram negativo para o GeneXpert MTB/RIF, BAAR e/ou cultura. Dos 120 participantes do estudo, 107 (89%) relataram ter tomado a vacina da BCG. Dos outros 13 indivíduos, nove não tomaram a vacina, dois não souberam informar e não houve o registro no estudo sobre a vacinação de dois indivíduos.

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos da população do estudo.

Características clínicas e demográficas	TB (n=45)	TBL (n=22)	CSC (n=30)	CSNC (n=14)	ODP (n=9)	Valor P
Idade, anos (média ± DP) ^a	37,4 ± 12,5	42,3 ± 15,3	40,5 13,02	± 30,5 ± 8,4	42 ± 9,3	0,0812 ^b
Sexo Biológico, n (%) ^a						
Masculino	27 (60)	5 (22,72)	11 (36,67)	5 (35,71)	5 (55,56)	0,0275^c
Feminino	17 (40)	17 (77,28)	19 (63,33)	9 (64,29)	4 (44,44)	
Xpert MTB/RIF, n (%)						
Positivo	45 (100)	-	-	-	0	-
Negativo	0	-	-	-	9 (100)	-
Baciloscopia, n(%)						
Positivo	29 (64,45)	-	-	-	8 (88,89)	-
Negativo	5 (11,11)	-	-	-	1 (11,11)	-
Não Informado	11 (24,44)	-	-	-		-
Cultura, n (%)						
Positivo	24 (53,33)	-	-	-	0	-
Negativo	0	-	-	-	5 (55,56)	-
Não Informado	21 (46,67)	22 (100)	30 (100)	14 (100)	4 (44,44)	-
IGRA, n (%)						
Positivo	-	22 (100)	0	0	-	-
Negativo	-	0	35 (100)	15 (100)	-	-
Vacina BCG, n (%)						
Sim	37 (82,23)	19 (86,36)	30 (100)	14 (100)	7 (77,78)	
Não	5 (11,11)	3 (13,64)	0	0	1 (11,11)	0,2078 ^c
Não sabe	1 (2,22)	0	0	0	1 (11,11)	
Não Informado	2 (4,44)	0	0	0	0	

TB: Tuberculose; TBL: Tuberculose Latente; CSC: Controle Sadios Contactantes; CSNC: Controle Sadios Não Contactantes; OPD: Outras Doenças Pulmonares; DP: Desvio padrão; IGRA: *Interferon Gamma Release Assay*; BCG: Bacille Calmette-Guérin;

^aDados ausentes: sexo (TB=1) e idade (TBL=1).

^b Teste Kruskal-Wallis

^c Teste Qui-Quadrado

Fonte: Elaboração da autora.

O objetivo inicial desse trabalho foi realizar uma análise exploratória para avaliar se existe alguma diferença estatística na dosagem dos anticorpos séricos IgG e IgM, em estímulo

aos extratos lipídicos das cepas WT e $\Delta mce1$ do Mtb (Figuras 7 e 8). Pela avaliação da dosagem de IgG (Figura 6A), observa-se uma redução nos níveis desse anticorpo no grupo TBL [mediana: 0,76 (IQR: 0,27-2,42)] em comparação ao grupo de pacientes com TB [mediana: 1,09 (IQR: 0,44-4,60); $P = 0,0213$], além disso observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes com ODP [mediana: 1,68 (IQR: 1,16-2,42)] em comparação ao grupo de voluntários CSC [mediana: 0,99 (IQR: 0,48-1,85); $P = 0,0007$], com TBL [mediana: 0,76 (IQR: 0,27-2,42); $P = 0,0002$] e ao grupo de voluntários CSNC [mediana: 0,79 (IQR: 0,30-2,03); $P = 0,0210$]. Pela avaliação da dosagem de IgM (Figura 6B), observa-se diferença estatística no grupo de voluntários com ODP [mediana: 2,42 (IQR: 0,84-4,32)] em comparação ao grupo de voluntários CSC [mediana: 0,93 (IQR: 0,44-3,87); $P = 0,0031$], com TBL [mediana: 0,93 (IQR: 0,42-2,14); $P = 0,0012$] e em comparação ao grupo de indivíduos CSNC [mediana: 0,98 (IQR: 0,36-1,93); $P = 0,0073$].

Em relação as dosagens de IgG e IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos incluídos no estudo (Figura 7A e 7B).

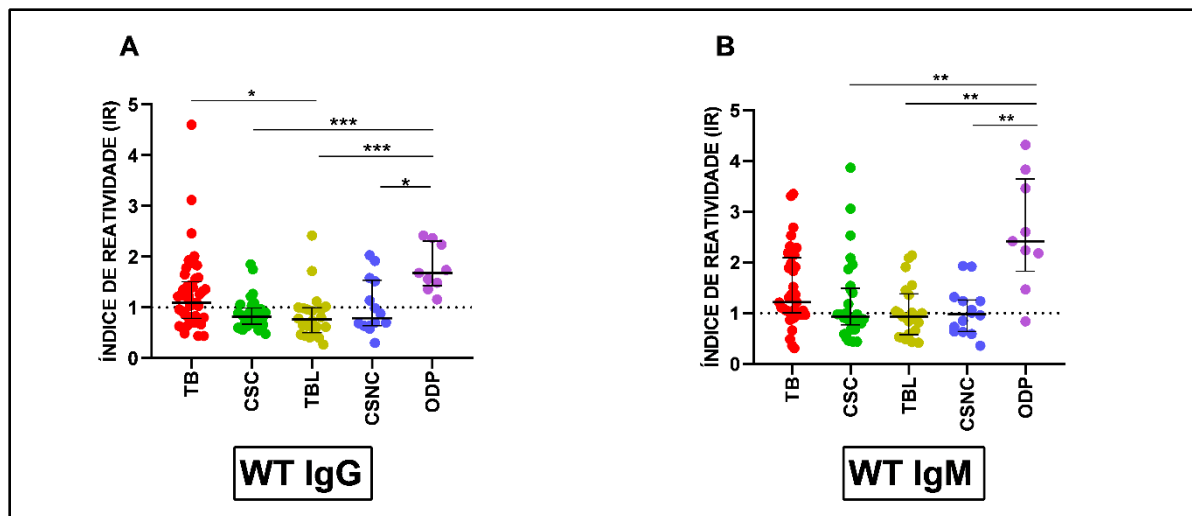


Figura 7 - Avaliação dos níveis de IgG e IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa selvagem (WT) pelo teste de ELISA. (A) Gráfico mostrando a dosagem de IgG, em estímulo ao extrato lipídico da cepa WT, nos grupos incluídos no estudo. (B) Gráfico mostrando a dosagem de IgM, em estímulo ao extrato lipídico da cepa WT, nos grupos incluídos no estudo. Tuberculose (TB); Controle sadio contactante (CSC); Tuberculose latente (TBL); Controle sadio não-contactante; Outras Doenças Pulmonares (ODP). Diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelas múltiplas comparações do teste de Dunn's. A dispersão da dosagem de IgG e IgM de cada grupo foi avaliada pelo índice de reatividade (IR), medianas e intervalo interquartil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaboração da autora.

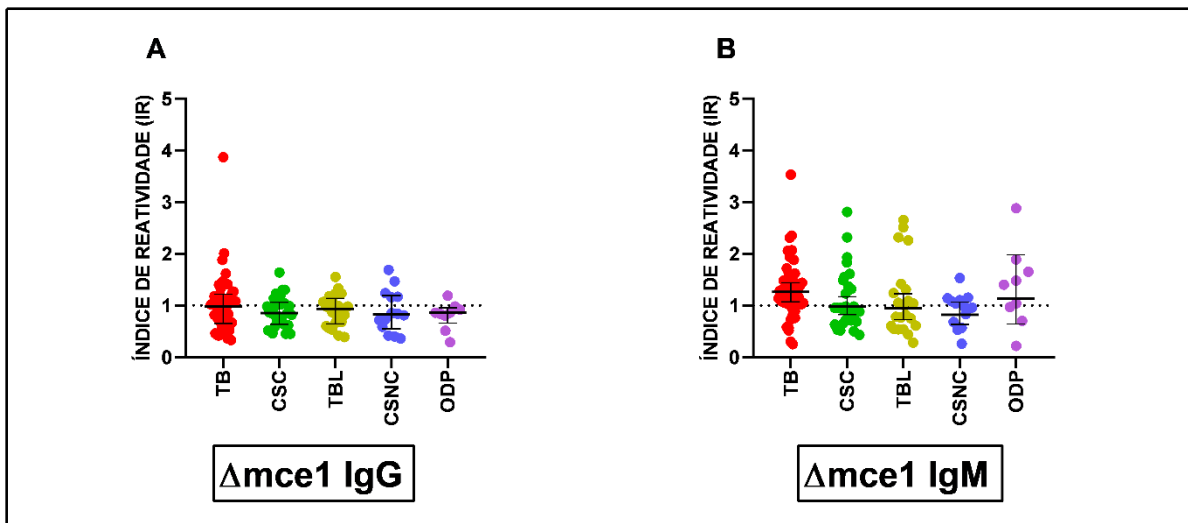


Figura 8 - Avaliação dos níveis de IgG e IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa mutante ($\Delta mce1$) pelo teste de ELISA. (A) Gráfico mostrando a dosagem de IgG, em estímulo ao extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$, nos grupos incluídos no estudo. (B) Gráfico mostrando a dosagem de IgM, em estímulo ao extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$, nos grupos incluídos no estudo. Tuberculose (TB); Controle sadio contactante (CSC); Tuberculose latente (TBL); Controle sadio não-contactante; Outras Doenças Pulmonares (ODP). Diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelas múltiplas comparações do teste de Dunn's. A dispersão da dosagem de IgG e IgM de cada grupo foi avaliada pelo índice de reatividade (IR), medianas e intervalo interquartil.

Fonte: Elaboração da autora.

Em seguida, foram realizadas análises para avaliar o desempenho dos ensaios de ELISA na detecção dos anticorpos séricos IgG e IgM dos voluntários do estudo, em estímulo ao extrato lipídico da cepa WT e $\Delta mce1$, respectivamente, utilizando análises para avaliação de parâmetros diagnósticos como curva ROC, sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança positiva e negativa, razão de chances de diagnóstico e índice kappa (Figuras 9 e 10). As áreas demarcadas em rosa-claro, nessas figuras, identificam os dois grupos, TB e CSC, que foram utilizados para determinação do ponto de corte do teste (cutoff) e aplicados para avaliar o desempenho dos extratos.

A condição clínica WT IgG (Figura 9A) apresenta o índice de reatividade (IR) de IgG sérico ao extrato lipídico da cepa WT do Mtb nos grupos testados do estudo. Ambos os grupos de comunicantes dos pacientes com TB (CSC e TBL) apresentaram tendência de redução do IR, com relação ao grupo TB, porém nenhuma diferença estatística foi observada devido a sobreposição dos intervalos de confiança (IC) de 95%. O grupo ODP apresentou os maiores níveis de IgG responsivos ao extrato WT se distinguindo das demais populações (IC de ODP não sobrepôs os ICs dos demais grupos). Pela avaliação da curva ROC dos grupos TB e controle CSC (Figura 9B), observa-se um moderado valor de AUC (69,2%), um IC de 95% de 57,5-81,1 e valor de $P = 0,0052$. Em relação aos parâmetros para avaliação do desempenho do teste (Figura

9C), observa-se valores moderados de especificidade, sensibilidade e acurácia, e baixos valores da razão de verossimilhança positiva e negativa, ODR e índice K.

A condição clínica WT IgM (Figura 9A) mostra um aumento moderado de IgM nos grupos TB e CSC, além de um aumento significativo de IgM no grupo ODP (sem sobreposição de ICs), com relação aos demais grupos. Pela avaliação da curva ROC dos grupos TB e controle CSC (Figura 9B), observa-se um AUC com valor moderado (65,7%), um IC de 95% de 52,4-79 e um valor de $P = 0,0219$. Em relação aos parâmetros para avaliação do desempenho do teste (Figura 9C), observa-se valores moderados de especificidade, sensibilidade e acurácia e baixos valores da razão de verossimilhança positiva e negativa, ODR e índice K. A avaliação desses testes evidencia que o ensaio WT-IgG exibiu valores de sensibilidade, especificidade e acurácia semelhantes ao WT-IgM. Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os dois ensaios, pois os ICs de 95% se sobrepuseram.

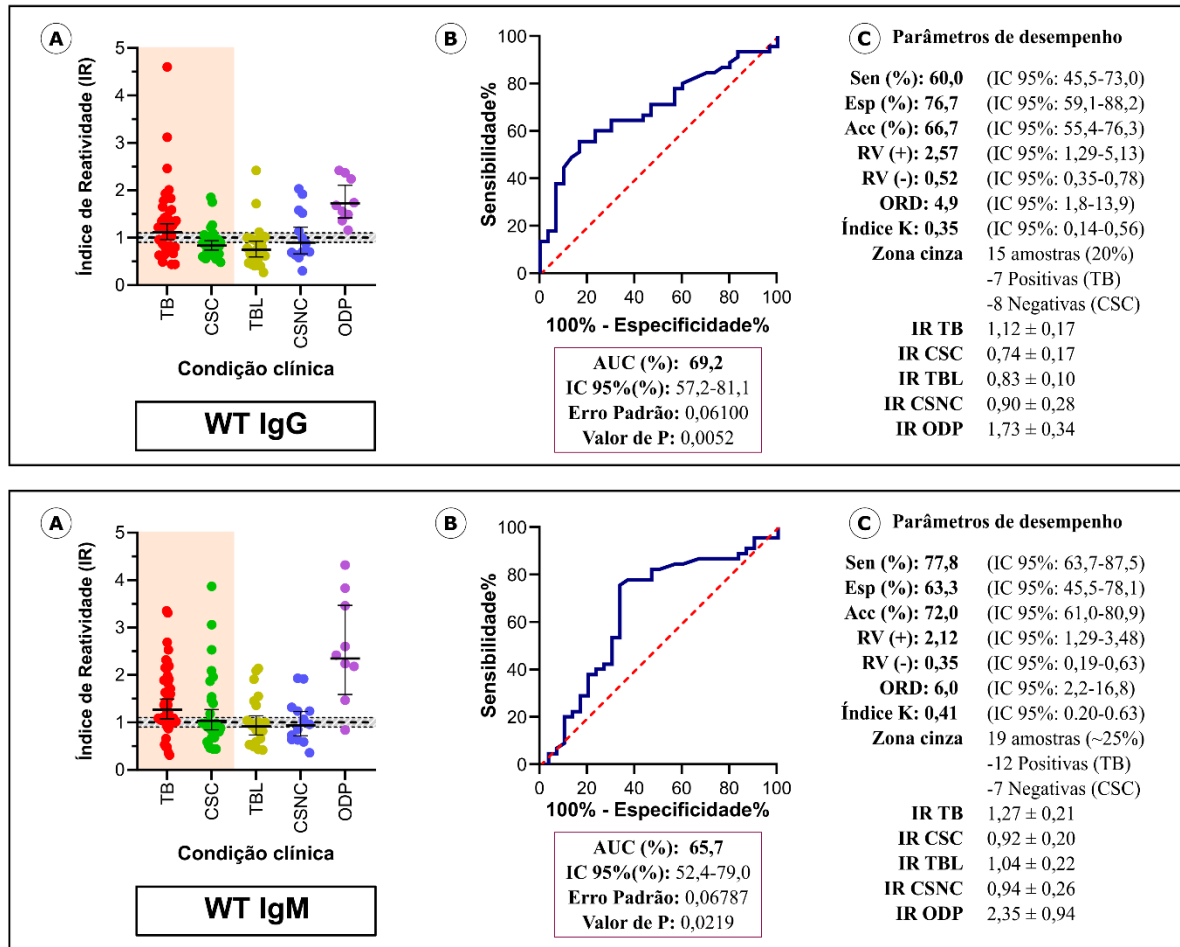


Figura 9 - Avaliação do desempenho do extrato lipídico WT usando a dosagem de IgG e IgM no teste de ELISA. (A) Gráficos mostrando o IR para cada antígeno testado contra um painel de 45 amostras positivas para tuberculose (TB) e 30 amostras de controle sadio contactante (CSC). O valor de corte é 1,0 e a área sombreada representa a zona cinza. As linhas horizontais e os números para cada grupo de resultados representam as médias geométricas (IC 95%). O teste também foi utilizado para analisar o sinal do IR produzido para 22 amostras de indivíduos com tuberculose latente (TBL), 14 de controles sadios contactantes (CSNC) e 9 amostras de indivíduos com outras doenças pulmonares (ODP). (B) Curva de Característica Operacional do Receptor (ROC) e AUC determinada para o antígeno WT. (C) Parâmetros de desempenho do antígeno determinados usando os ensaios mostrados no painel A. 95% IC (intervalo de confiança de 95%); Acc (acurácia); AUC (área sob a curva ROC); ODR (razão de chances de diagnóstico); K (índice Kappa); RV (razão de verossimilhança); IR (índice de reatividade); Sen (sensibilidade); Esp (especificidade).

Fonte: Elaboração da autora.

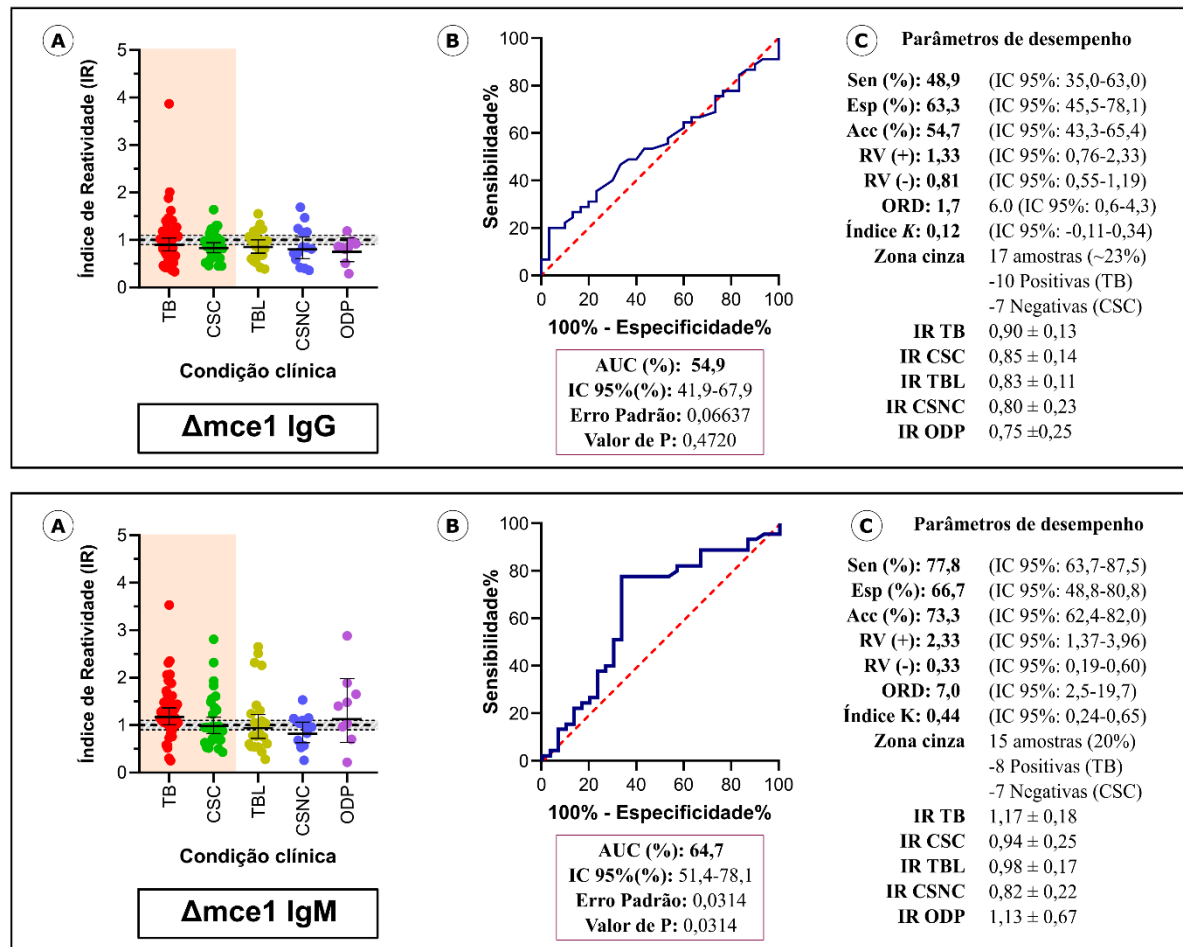


Figura 10 - Avaliação do desempenho do extrato lipídico $\Delta mce1$ usando a dosagem de IgG e IgM no teste de ELISA. (A) Gráficos mostrando o IR para cada antígeno testado contra um painel de 45 amostras positivas para tuberculose (TB) e 30 amostras de controle sadio contactante (CSC). O valor de corte é 1,0 e a área sombreada representa a zona cinza. As linhas horizontais e os números para cada grupo de resultados representam as médias geométricas (IC 95%). O teste também foi utilizado para analisar o sinal do IR produzido para 22 amostras de indivíduos com tuberculose latente (TBL), 14 de controles sadios contactantes (CSNC) e 9 amostras de indivíduos com outras doenças pulmonares (ODP). (B) Curva de Característica Operacional do Receptor (ROC) e AUC determinada para o antígeno WT. (C) Parâmetros de desempenho do antígeno determinados usando os ensaios mostrados no painel A. 95% IC (intervalo de confiança de 95%); Acc (acurácia); AUC (área sob a curva ROC); ODR (razão de chances de diagnóstico); K (índice Kappa); RV (razão de verossimilhança); IR (índice de reatividade); Sen (sensibilidade); Esp (especificidade).

Fonte: Elaboração da autora.

Os IRs de IgG ao extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$ foram indistinguíveis entre as populações de todos os grupos (Figura 10A) e a análise de curva ROC mostrou um baixo valor de AUC (54,9 %) (IC de 95% de 41,9-67,9; valor de P > 0,05) (Figura 10B). Em relação aos parâmetros para avaliação do desempenho do teste, observa-se baixos valores de especificidade, sensibilidade, acurácia, razão de verossimilhança positiva e negativa, ODR e índice K (Figura 10C).

A produção de anticorpos IgM responsivos $\Delta mce1$ também foi muito semelhante entre os grupos avaliados (Figura 10A). Esse ensaio demonstrou um desempenho moderado na avaliação da curva ROC, observa-se um moderado valor de AUC (64,7 %) (IC de 95% de 51,4-78,1 e valor de $P=0,0314$) (Figura 10B). Em relação aos parâmetros para avaliação do desempenho do teste, observa-se valores moderados de especificidade, sensibilidade e acurácia e baixos valores da razão de verossimilhança positiva e negativa, ODR e índice K (Figura 10C).

A Figura 11 representa graficamente as dosagens dos anticorpos séricos IgG e IgM testados em estímulo aos lipídios do Mtb, pelo IR e IC de 95%. Essa figura confirma os dados observados anteriormente que mostraram sobreposição dos ICs entre os grupos testados no estudo, em todas as condições experimentais testadas, com exceção do grupo ODP nos ensaios com o extrato lipídico da cepa WT e anticorpos IgG e IgM.

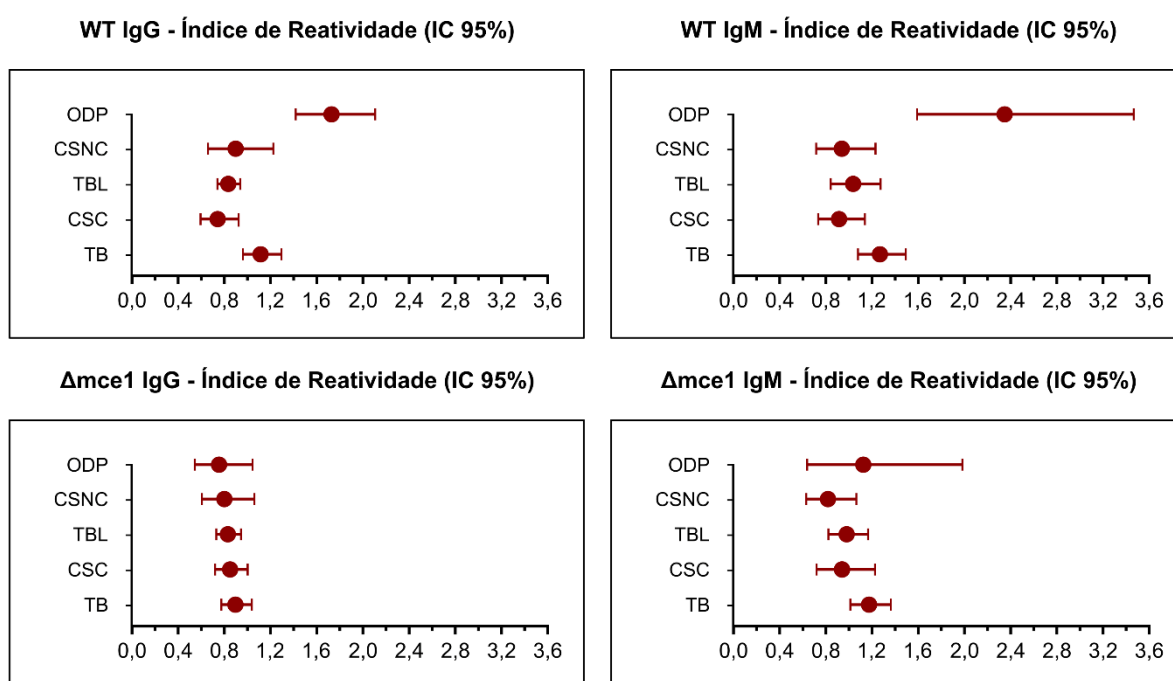


Figura 11 - Representação gráfica de intervalos de confiança de 95% (IC 95%) de WT IgG, WT IgM, $\Delta mce1$ IgG e $\Delta mce1$ IgM.

Fonte: Elaboração da autora.

A Figura 12 mostra o desempenho dos testes WT-IgG (1), WT-IgM (2), $\Delta mce1$ -IgG (3) e $\Delta mce1$ -IgM (4), usando como parâmetros os valores de sensibilidade e especificidade. Nota-se um baixo desempenho de todas as condições. Observa-se que o teste WT-IgG (1) apresenta melhor especificidade (76,7%), porém moderada sensibilidade (60%), enquanto os testes WT-IgM e $\Delta mce1$ -IgM (2 e 4) apresentam as melhores sensibilidades (77,8%), porém moderada

especificidade (63,3% e 66,7% respectivamente). O teste que apresentou o pior desempenho foi o $\Delta mce1$ -IgG (63,3% de especificidade e 48,9% de sensibilidade).

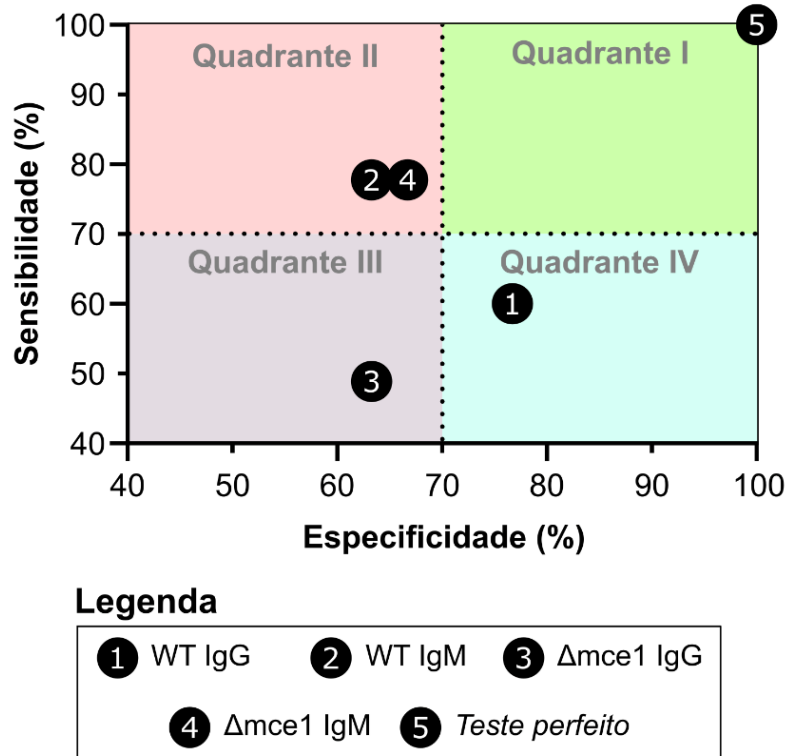


Figura 12 - Avaliação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos imunoensaios. 1) Elisa Indireto com detecção de IgG em estímulo ao extrato lipídico da cepa WT. 2) Elisa Indireto com detecção de IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa WT. 3) Elisa Indireto com detecção de IgG em estímulo ao extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$. 4) Elisa Indireto com detecção de IgM em estímulo ao extrato lipídico da cepa $\Delta mce1$. 5) Teste considerado perfeito.

Fonte: Elaboração da autora.

6 DISCUSSÃO

Apesar da parede celular do Mtb ser constituída, em sua maioria, por lipídios, como ácidos micólicos (AM) e glicolipídios, incluindo diaciltrealose, poliaciltrealose, lipomanana, LAM, LAM capeado por manose, sulfolipídios e trealose-6,6'-dimicolato (DRAPER, 1998), os extratos contendo essas moléculas não demonstraram bom desempenho em diferenciar os grupos selecionados no presente estudo. No trabalho de Queiroz e Ryley em 2017, foi discutido sobre o papel dos lipídios da parede celular do Mtb no desenvolvimento da TB. Como já mencionado anteriormente, foi proposto, nesta revisão, um modelo de “*imunoestado mycobacteriano*” para a regulação dos lipídios presentes na parede celular do Mtb, além de inferir que a diferença na expressão desses lipídios determina se o bacilo entrará, ou não, na fase crônica da infecção.

Por acreditar que essas moléculas estão associadas a uma resposta imune distinta no hospedeiro durante a primeira fase de infecção, avaliou-se, no presente trabalho, a quantificação de imunoglobulinas G e M em estímulo aos extratos lipídicos das cepas WT e $\Delta mce1$ do Mtb, por assumir que esses anticorpos poderiam diferenciar os grupos avaliados. No trabalho de Queiroz e colaboradores em 2015, identificou-se um perfil de mais de 400 espécies lipídicas significativamente alteradas na cepa $\Delta mce1$ em comparação com a WT. Dentre os lipídios que foram drasticamente diminuídos na cepa $\Delta mce1$, encontram-se: sacarolipídios, glicerofosfolipídios, o ácido graxo Phitenoico e o ácido Phitioceranico, além de evidenciar um aumento dos níveis dos AM alfa-, metoxi- e cetomicólicos e do ácido hidroxiftiocerânico. Apesar da evidência que a quantificação dos lipídios do Mtb é diferente em ambas as cepas, isso não parece interferir significativamente na produção dos anticorpos IgG e IgM em exposição à essas moléculas, uma vez que os níveis dessas imunoglobulinas nos grupos testados foram semelhantes nos dois extratos.

Uma das suposições que explica os níveis similares dessas imunoglobulinas aos lipídios do Mtb, nos diferentes grupos do estudo, é a exposição dos indivíduos testados à diferentes fontes de lipídios no organismo como a microbiota intestinal. A microbiota intestinal regula muitos processos metabólicos no hospedeiro, incluindo homeostase energética, metabolismo da glicose e metabolismo lipídico (revisado em SONNENBURG; BÄCKHED, 2016). Esse último inclui a biossíntese e degradação de lipídios, como ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol. Um estudo com análises de lipidômica em camundongos alimentados com ração regular demonstrou que a microbiota intestinal afeta a composição lipídica em tecidos do

hospedeiro e no soro, aumentando a depuração de triglicerídeos da circulação (VELAGAPUDI et al., 2010).

Ademais, lipídios podem estar localizados em gotículas armazenadas nas células (WELTE; GOULD, 2017) ou circular no sangue como complexos de lipoproteínas (FERNANDEZ et al., 2013). Glicolipídios, por exemplo, demonstraram desenvolver um papel importante no sistema imunológico (ZHANG et al., 2019). Os glicerolipídios, como o triacilglicerol, podem ser encontrados nas membranas dos procariontes, como o Mtb, eucariontes e em tecidos de gordura animal, e são geralmente considerados como um reservatório de energia (PARK et al., 2021). Glicerofosfolipídios e fosfolipídios são os principais lipídios constituintes da membrana celular eucariótica. Os fosfolipídios são moléculas simples, porém são compostos importantes que contribuem para as atividades da vida. Eles são encontrados em humanos, animais, plantas e bactérias, e são considerados o esqueleto das membranas celulares e subcelulares, nas quais se montam como uma bicamada (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). Os AM, por sua vez, são a marca registrada do envelope celular do Mtb, além de espécies e gêneros relacionados (DAFFÉ; DRAPER, 1997) como *Corynebacterium*, *Hoyosella*, *Amicolicoccus*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia* e *Tsukamurella* (MARRAKCHI; LANÉELLE; DAFFÉ, 2014). AM micobacterianos e corinebacterianos diferem em seu comprimento de cadeia, modificações e ramificações (BARRY et al., 1998). Apesar de serem moléculas características da parede celular do Mtb, a sua presença junto aos demais lipídios dos extratos não foi suficiente para produzir uma resposta específica que diferenciasse os pacientes TB dos demais grupos. Uma vez que alguns lipídios presentes no envelope celular do Mtb também estão presentes em outras estruturas celulares, como também em outros microrganismos, podem ser reconhecidos como antígenos estranhos e estimular a produção de imunoglobulinas específicas a eles através de uma resposta cruzada.

Apesar da quantificação dos níveis de anticorpos entre os grupos testados serem semelhantes, avaliando-se pela média geométrica e IC de 95%, algumas considerações importantes podem ser exploradas. Para o controle da TB, dois testes são interessantes na clínica: para prognóstico (avaliação da ativação da TBL para a doença ativa) e diagnóstico (diferenciação dos indivíduos sintomáticos respiratórios não-TB dos indivíduos infectados). As análises desse estudo revelam que nos ensaios WT-IgG e IgM (Figura 6A), existe uma tendência dos indivíduos do grupo TB terem uma maior produção desses anticorpos do que os indivíduos do grupo TBL. Essas análises podem ser aprimoradas com o intuito de identificar

lipídios específicos da cepa WT que possam ser isolados e explorados como marcadores sorológicos de ativação da doença.

Ademais, um bom teste para identificação dos indivíduos SR seria aquele que conseguisse distinguir indivíduos TB daqueles com ODP. Curiosamente, os dados desse trabalho demonstram maior quantificação dos níveis de anticorpos IgG e IgM no grupo ODP (condição clínica WT) (Figura 6), sendo o único que consegue diferenciar significativamente dos demais grupos testados, embora o padrão esperado fosse que os indivíduos com TB tivessem maior quantificação dessas imunoglobulinas em comparação aos demais. Uma hipótese que explica esse fenômeno é em relação a disbiose na microbiota dos pulmões. Historicamente, os pulmões são considerados estéreis e as doenças pulmonares só foram estudadas no contexto da patogênese (DICKSON; ERB-DOWNWARD; HUFFNAGLE, 2013; DICKSON; HUFFNAGLE, 2015). No entanto, recentemente, estudos sobre RNA ribossômico 16s (rRNA) e metagenômica revelaram uma microbioma resiliente na parte superior e inferior do trato respiratório, além de evidências crescentes de seu papel central em doenças respiratórias (DICKSON; ERB-DOWNWARD; HUFFNAGLE, 2013; HOSGOOD et al., 2014). A Figura 13 demonstra as regiões anatômicas do pulmão de acordo com a microbiota residente. A microbiota oral tem sido identificada como uma das principais contribuintes para o microbioma pulmonar (VENKATARAMAN et al., 2015).

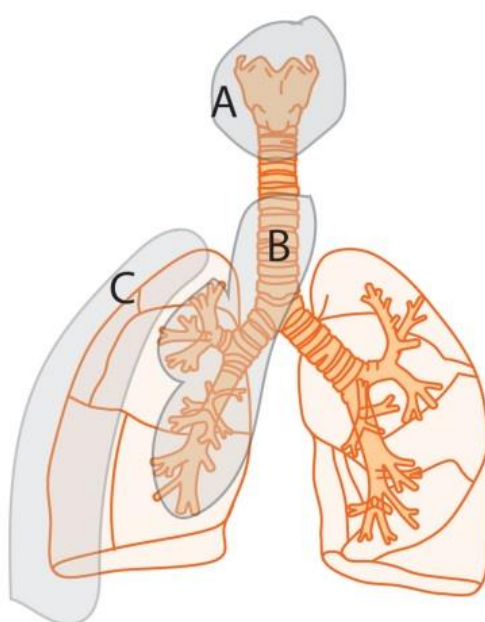


Figura 13 - Diferentes regiões anatômicas do pulmão, representando assinaturas microbianas únicas. O ambiente influencia fortemente o microbioma oral/nasal (A), que por sua vez, influencia a microbiota respiratória superior (B). A resiliência e a singularidade do microbioma no sistema respiratório inferior (C) tem sido controverso devido aos desafios nas técnicas de amostragem e pipelines de análise
Fonte: (MENDEZ et al., 2019).

Na literatura, poucos estudos descrevem os efeitos da microbiota do pulmão no organismo (DICKSON; HUFFNAGLE, 2015; O'DWYER; DICKSON; MOORE, 2016). Porém, alguns estudos relataram influência do microbioma pulmonar na patogênese da asma/doenças alérgicas (RISNES et al., 2011; MCKEEVER et al., 2002), além da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (ERB-DOWNWARD et al., 2011; CABRERA-RUBIO et al., 2012; PRAGMAN et al., 2012; SZE et al., 2012). A fibrose cística, por exemplo, é uma das complicações pulmonares mais pesquisadas em relação à disbiose microbiana (STRESSMANN et al., 2011). Em todos esses estudos, a disbiose da microbiota, caracterizada pela expansão de comunidades microbianas específicas, tem sido um ponto central para o tipo de doença, acompanhada de inflamação descontrolada.

Em contrapartida, evidências ao longo dos anos indicam um papel direto e indireto da microbiota intestinal no contexto de doenças pulmonares (HUFFNAGLE, 2010; FAGUNDES et al., 2012; CLARKE et al., 2010; BINGULA et al., 2017). A composição específica da microbioma pulmonar em indivíduos saudáveis e doentes tem atraído estudos em humanos para definir alterações exatas nessa região devido a condições específicas da doença, por exemplo, na fibrose cística (BRUZZESE et al., 2014). Evidências clínicas sugerem que a restauração do microbioma intestinal tem prognóstico positivo para a homeostase microbiana do pulmão e, por associação, na homeostase imunológica pulmonar (O'DWYER; DICKSON; MOORE, 2016; BRUZZESE et al., 2014; ABRAHAMSSON et al., 2012). Esses dados indicam que o desequilíbrio na microbiota pulmonar (levando ao aumento de bactérias patogênicas) em consequência de doenças respiratórias como asma, DPOC, fibrose cística, dentre outras, pode está relacionado com o aumento dos níveis das imunoglobulinas G e M em estímulo aos lipídios do Mtb no presente trabalho, por consequência de uma resposta cruzada a esses antígenos lipídicos. A Tabela 2 sumariza as mudanças relacionadas ao microbioma do pulmão de acordo com a influência do meio ambiente e as doenças associadas.

Tabela 2 - Resumo de alterações microbianas pulmonares documentadas devido a fatores ambientais e doenças. VSR: Vírus sincicial respiratório

Doença ou fator ambiental	Aumento em relação a abundância (Filos/ classe/gênero)	Diminuição em relação a abundância ila/ classe/gêneros)	Gêneros
Asma	<i>Proteobactéria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Haemophilus, Moraxella, Neisseria, Prevotella, Veillonell</i>
Fumo	Não reportado	Não reportado	Não reportado
DPOC	<i>Proteobacteria, Bacteriodetes, Actinobacteria, Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Haemophilus, Pseudomonas, Prevotella, Streptococcus, Moraxella, Acinetobacter, Fusobacterium, Neisseria</i>
Fibrose Cística	<i>Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria</i>	Não reportado	<i>Streptococcus, Staphylococcus, Mycobacterium, Hemophilus, Burkholderia, Pseudomonas, Stenotrophomonas</i>
Câncer de pulmão	<i>Proteobacteria, Firmicutes TM7</i>	Não reportado	<i>Thermus, Legionella, Veillonella, Megasphaer</i>
Influenza A	<i>Lactobacillus, Streptococcus</i>	<i>Bacillus, Pseudomonas</i>	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Bacillus, Pseudomona</i>

Rhinovirus e VSR	<i>Moraxella,</i> <i>Streptococcus,</i> <i>Corynebacterium,</i> <i>Hemophilus,</i> <i>Dolosigranulum</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Moraxella,</i> <i>Streptococcus,</i> <i>Corynebacterium,</i> <i>Hemophilus,</i> <i>Dolosigranulum,</i> <i>Staphylococcus</i>
------------------	--	-----------------------	--

Fonte: (Adaptado de VENKATARAMAN et al., 2015).

Um das limitações desse presente trabalho é que os pacientes do grupo ODP foram abordados no momento inicial de realização do teste do escarro para diagnóstico da TB, por isso, não foi possível obter informações sobre o verdadeiro diagnóstico das suas doenças respiratórias. Porém, foram pacientes selecionados como SR e supostamente apresentam umas das condições clínicas indicadas na Tabela 2. Além do mais, de acordo com as representações gráficas da Figura 11, identifica-se através da avaliação do IR e IC de 95% que a condição WT-IgG e IgM apresenta bom desempenho na separação dos grupos ODP x TB. Esse resultado pode ser refinado no intuito de identificar lipídios específicos da cepa WT do Mtb, os quais poderiam ser utilizados para o diagnóstico diferencial de pacientes sintomáticos respiratórios, como um futuro teste diagnóstico de triagem que exclua pacientes com ODP devido ao aumento da produção de anticorpos em estímulo a esses lipídios específicos.

Com relação aos testes realizados, foi montada a Figura 12 com o objetivo de avaliar o desempenho desses em relação à sensibilidade e especificidade em comparação a um teste considerado perfeito (100% especificidade e sensibilidade). Com essas análises podemos observar que a condição WT-IgM (77,8% de sensibilidade e 63,3% de especificidade) e a condição $\Delta mce1$ -IgM (77,8% de sensibilidade e 66,7% de especificidade) representam os testes que demonstraram melhor desempenho em diferenciar os grupos testados e poderiam ser refinados no intuito de avaliar anticorpos IgG e IgM específicos a lipídios isolados do Mtb, aumentando a acurácia e especificidade do teste.

Avaliar testes diagnósticos usando apenas as medidas de desempenho de sensibilidade, especificidade e acurácia é insuficiente para medir seu impacto nas decisões clínicas. Um teste diagnóstico só é útil se seus resultados alterarem a probabilidade de ocorrência da doença. A determinação da razão de verossimilhança (RV) é útil para descrever o poder discriminatório de um teste e define a probabilidade de um determinado resultado em indivíduos infectados em

comparação com a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos saudáveis. Nesse estudo, todos os quatro ensaios mostraram valores semelhantes para RV positiva (+ LR ~ 2,0) e negativa, com exceção da condição $\Delta mce1$ -IgG que apresentou RV positiva = 1,33. Uma RV positiva indica que uma pessoa infectada com TB tem aproximadamente duas vezes mais probabilidade de ter TB quando testada com esses antígenos lipídicos nas condições WT-IgG, WT-IgM e $\Delta mce1$ -IgM. Os valores de ODR também foram baixos para todos os quatro testes (4,9 para WT-IgG, 6,0 para WT-IgM, 1,7 para $\Delta mce1$ -IgG e 7,0 para $\Delta mce1$ -IgM). Esses valores indicam que a probabilidade de um diagnóstico correto (por exemplo, para $\Delta mce1$ -IgM) é sete vezes maior, independentemente da condição clínica. No entanto, esses valores são muito baixos em comparação com estudos para outras doenças.

De fato, um estudo publicado em 2019 mostrou que um antígeno quimérico testado para a doença de chagas produziu um valor de DOR de 2.422.000 (DEL-REI et al., 2019). No estudo de Greco et al., 2009, realizou-se uma meta-análise para avaliar a acurácia do PCR In-house para diagnóstico da TB pulmonar em pacientes com esfregaço positivo. Os valores estimativos da razão de chances de diagnóstico, sensibilidade e especificidade dos estudos selecionados foram, respectivamente: 60 (29 - 23), 0,96 (0,95 - 0,97) e 0,81 (0,78 - 0,84). No estudo de Castro et al., 2020, realizou-se uma meta-análise para avaliar a acurácia de testes diagnósticos comercialmente disponíveis no Brasil para diagnóstico da COVID-19, na plataforma online da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Nesse trabalho, avaliou-se a sensibilidade, especificidade, razão de chances de diagnóstico (ODR) e curvas ROC para detecção de anticorpos IgM/IgG em 16 testes cadastrados, a maioria testes rápidos. As medidas de precisão diagnósticas agrupadas [IC 95%] foram: para anticorpos IgM Sen = 82% [76-87]; Esp = 97% [96-98]; ODR = 168 [92-305] e AUC = 0,98 [0,96-0,99]; para anticorpos IgG Sen= 97% [90-99]; Esp = 98% [97-99]; ODR = 1994 [385-10334] e AUC= 0,99 [0,98-1,00]. Um outro exemplo, é o estudo de Gao et al., 2019, nesse realizou-se uma meta-análise para investigar o valor diagnóstico da colonografia por ressonância magnética e colonografia por tomografia computadorizada para a vigilância do câncer colorretal (CCR). Vinte e cinco estudos incluindo 2.985 indivíduos foram selecionados na análise final. Nesse estudo, a sensibilidade, especificidade, ODR e AUC para detecção de CCR foram 0,98 (intervalo de confiança de 95%, IC: 0,80-1,00), 0,94 (IC 95%: 0,85-0,97), 115,09 (IC 95%: 15,37-862,01) e 0,98 (IC 95%: 0,97-0,99), respectivamente.

Nos trabalhos citados, observa-se que os parâmetros utilizados para avaliação de desempenho dos testes são superiores aos encontrados nessa dissertação. No entanto, a intenção

desse estudo foi explorar a detecção de anticorpos séricos em estímulo aos diferentes extratos lipídicos do Mtb, e se conseqüentemente, apresentam um bom desempenho em diferenciar os grupos selecionados para futuramente serem utilizados como biomarcadores de doença e infecção.

7 CONCLUSÕES

Os extratos lipídicos do Mtb apresentaram capacidade limitada em diferenciar os grupos testados no estudo pelas dosagens de IgG e IgM. Entretanto, observou-se um aumento nos títulos de anticorpos responsivos aos extratos lipídicos do Mtb no grupo ODP. Esse resultado pode ser explorado para o desenvolvimento de uma ferramenta diagnóstica diferencial de indivíduos com ODP e TB. Uma possibilidade é o desenvolvimento de um teste rápido de triagem e que pode ser aplicado em locais com recursos limitados e que não dispõem de infraestrutura para o diagnóstico da TB. Além disso, mais estudos devem ser realizados buscando avaliar o papel de espécies lipídicas isoladas do Mtb como possíveis marcadores de prognóstico (diferenciação da população latente da doença ativa) ou diagnóstico da doença, como forma de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, T. R. et al. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, 2012.
- ACHARYA, B. et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 4065–4075, 2020.
- ACHKAR J.M, JENNY-AVITAL E.R. Incipient and subclinical tuberculosis: defining early disease states in the context of host immune response. **J Infect Dis** 204(Suppl 4):S1179 –S1186. 2011.
- ACHKAR, J. M.; CHAN, J.; CASADEVALL, A. B cells and antibodies in the defense against Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunological Reviews**, v. 246, p. 167-181, 2015.
- ANDERSON, R. J. The chemistry of the lipids of the tubercle bacillus. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 15, n. 3, p. 311, 1943.
- ASHENAFI, S. et al. Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3. **Clinical Immunology**, v. 151, n. 2, p. 84–99, abr. 2014.
- BARRY, C. E. et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog. Lipid Res**, v. 37, p. 143–179, 1998.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: Rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–855, 2009.
- BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 1, p. 34–46, 2010.
- BEKIERKUNST, A. et al. Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions. **Journal of Bacteriology**, v. 100, n. 1, p. 95-102, 1969.
- BEN-SELMA, W. et al. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM, and IgA antibodies to mycobacterial A60 antigen in active tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 1, p. 55–59, 1 set. 2010.
- BINGULA, R. et al. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. **Journal of Oncology**, 2017.
- BLOCH, H. Studies on the virulence of tubercle bacilli: isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms, 1949.
- BOHRER, A. C. et al. Eosinophils are part of the granulocyte response in tuberculosis and promote host resistance in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 10, 4 ago. 2021.

BOMBARDA, S. et al. Imagem em tuberculose pulmonar. **J Pneumol**, v. 27, n. 6, p. 329-340, 2001.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Tuberculose, 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br>. [Acessado em 15 de maio de 2022].

BRUZZESE, E. et al. Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with lactobacillus GG: A randomised clinical trial. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2014.

CABRERA-RUBIO, R. et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3562–3568, nov. 2012.

CAI, Y. et al. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 19 mar. 2014.

CANTRELL, S. A. et al. Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the *mce1* operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiology**, 2013.

CASADEVALL, A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: Two-dimensional thinking comes full circle. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4225-4228, 2003.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. A new synthesis for antibody-mediated immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 1, p. 21-28, 2012.

CASALI, N.; RILEY, L. W. A phylogenomic analysis of the Actinomycetales *mce* operons. **BMC Genomics**, v. 8, 2007.

CASALI, N.; WHITE, A. M.; RILEY, L. W. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* operon. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 441–449, 2006.

CASTRO, R. et al. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 180–187, 1 mar. 2020.

CERUTTI, A.; PUGA, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 118–132, 2013.

CHAN, J. et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 588–600, 2014.

CHOUDHARY, A. et al. Characterization of the Antigenic Heterogeneity of Lipoarabinomannan, the Major Surface Glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis*, and Complexity of Antibody Specificities toward This Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 9, p. 3053–3066, 1 maio 2018.

CLARKE, T. B. et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. **Nature Medicine**, v. 16, n. 2, p. 228–231, fev. 2010.

CLIFF, J. M. et al. Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 18–29, 1 jan. 2013.

CLINIC, M.; MISNER, L. TB testing: new approaches to old scourge. 2018.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 132–203, 1997.

DEL-REI, R. P. et al. Detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.

DE SIQUEIRA, H. R. Enfoque Clínico da Tuberculose Pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 15–18, 2012.

DICKSON, R. P.; ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. The role of the bacterial microbiome in lung disease. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 7, n. 3, p. 245–257, 2013.

DICKSON, R. P.; HUFFNAGLE, G. B. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2015.

DOS SANTOS, D. C. M. et al. Serological biomarkers for monitoring response to treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in children and adolescents. **Tuberculosis**, v. 123, 2020.

DRAPER, P. THE OUTER PARTS OF THE MYCOBACTERIAL ENVELOPE AS PERMEABILITY BARRIERS. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 1253–1261, 1998.

DRAIN, P. et al. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1-24, 2018.

DU PLESSIS, W. J. et al. The functional response of B cells to antigenic stimulation: A preliminary report of latent tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016.

EHRENSTEIN, M. R.; NOTLEY, C. A. The importance of natural IgM scavenger, protector and regulator. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 11, p. 778–786, 2010.

ERB-DOWNWARD, J. R. et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FAGUNDES, C. T. et al. Transient TLR Activation Restores Inflammatory Response and Ability To Control Pulmonary Bacterial Infection in Germfree Mice. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1411–1420, 1 fev. 2012.

FERNANDEZ, C. et al. Plasma Lipid Composition and Risk of Developing Cardiovascular Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 15 ago. 2013.

FOUNTAIN, J. J. et al. Differential and Site Specific Impact of B Cells in the Protective Immune Response to Mycobacterium tuberculosis in the Mouse. **PLoS ONE** v. 8, n. 4, 2013.

GAO, Y. et al. Diagnostic value of magnetic resonance and computed tomography colonography for the diagnosis of colorectal cancer: A systematic review and meta-Analysis. **Medicine (United States)**, v. 98, n. 39, 1 set. 2019.

GELUK, A. et al. Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of Mycobacterium leprae and T-cell cross-reactivity with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2544–2548, 2002.

GILLERON, M. et al. Diacylated Sulfoglycolipids Are Novel Mycobacterial Antigens Stimulating CD1-restricted T Cells during Infection with Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 649–659, 2004.

GLATMAN-FREEDMAN, A. The role of antibody-mediated immunity in defense against Mycobacterium tuberculosis: Advances toward a novel vaccine strategy. **Tuberculosis**, p. 191–197, 2006.

GLICKMAN, M. S. et al. of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a Discipline Albert Einstein College of Medicine. v. 104, p. 477–485, 2001.

GOODRIDGE, A. et al. Anti-phospholipid antibody levels as biomarker for monitoring tuberculosis treatment response. **Tuberculosis**, v. 92, n. 3, p. 243–247, 2012.

GRECO, S. et al. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: Meta-analysis and metaregression. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 569–576, mar. 2009.

GUILLIAMS, M. et al. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 95–108, 2014.

HAMASUR, B. et al. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F (ab ϕ) 2 fragment prolong survival of mice infected with Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 30–38, 2004.

HETT, E. C. et al. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. v. 72, n. 1, 2008.

HOSGOOD, H. D. et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 8, p. 643–651, 1 out. 2014.

- HUFFNAGLE, G. B. The microbiota and Allergies/Asthma. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–3, 2010.
- INOUE, T. et al. Generation of memory B cells and their reactivation. **Immunological Reviews**, v. 283, p. 138-149, 2018.
- KAFOROU, M. et al. Detection of Tuberculosis in HIV-Infected and -Uninfected African Adults Using Whole Blood RNA Expression Signatures: A Case-Control Study. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 10, 2013.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.
- LASCO, T. M. et al. Rapid Accumulation of Eosinophils in Lung Lesions in Guinea Pigs Infected with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1147–1149, fev. 2004.
- LATORRE, I. et al. Evaluating the non-tuberculous mycobacteria effect in the tuberculosis infection diagnosis. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 2, p. 338–342, fev. 2010.
- LÖNNROTH, K.; RAVIGLIONE, M. Global epidemiology of tuberculosis: Prospects for control. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 5, p. 481–491, 2008.
- LOUDON, R. G.; ROBERTS, R. M. Droplet expulsion from the respiratory tract. **American Review of Respiratory Disease**, v. 95, n. 3, p. 435–442, 1967.
- LUND, F. E.; RANDALL, T. D. Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4+ T cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n. 4, p.236-247, 2010.
- MA, Z. et al. Screening and evaluation of Mycobacterium tuberculosis diagnostic antigens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1959–1970, 1 out. 2020.
- MAGLIONE, P. J.; CHAN, J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Immunology**, 2009.
- MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M. A.; DAFFÉ, M. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. **Chemistry and Biology**, v. 21, n. 1, p. 67–85, 16 jan. 2014.
- MCKEEVER, T. M. et al. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: A birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 1, p. 43–50, 2002.
- MENDEZ, R. et al. **Lung inflammation and disease: A perspective on microbial homeostasis and metabolism** IUBMB Life Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2019.
- MICHELLE K. HAAS et al. Diagnostic Tests for Latent Tuberculosis Infection Clinics in Chest Medicine W.B. Saunders. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**, 2019.

NUNES-ALVES, C. et al. protective immunity to TB. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.

O'DWYER, D. N.; DICKSON, R. P.; MOORE, B. B. The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 12, p. 4839–4847, 15 jun. 2016.

ORME, I. M.; BASARABA, R. J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 601-609, 2014.

PABST M. J. et al. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 2, p. 634–640, 1988.

PAI M, et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1-23, 2016.

P ANDERSEN et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. **The Lancet**, v. 356, p. 1099–1104, 2000.

PAI, M.; RILEY, L. W.; JR, J. M. C. Review Interferon- assays in the immunodiagnosis of tuberculosis : a systematic review. v. 4, n. December, p. 761–776, 2004.

PARK, J. et al. Bioactive lipids and their derivatives in biomedical applications. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 465–482, 1 set. 2021.

PETHE, K. et al. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. **Nature**, v. 412, p. 190-194, 2001.

PETRILLI, J. D. et al. Whole blood mRNA expression-based targets to discriminate active tuberculosis from latent infection and other pulmonary diseases. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020a.

PETRILLI, J. D. et al. Differential Host Pro-Inflammatory Response to Mycobacterial Cell Wall Lipids Regulated by the *Mce1* Operon. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1848, p. 1-10, 2020b.

PRAGMAN, A. A. et al. The Lung Microbiome in Moderate and Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 11 out. 2012.

PUPOVAC, A.; GOOD-JACOBSON, K. An antigen to remember: regulation of B cell memory in health and disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 45, p. 89–96, 2017.

QUEIROZ, A. et al. Comparative metabolic profiling of *mce1* operon mutant vs wild-type *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Pathogens and disease**, v. 73, n. 8, 2015.

- QUEIROZ, A.; RILEY, L. W. Bacterial immunostat: Mycobacterium tuberculosis lipids and their role in the host immune response. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 2017.
- RELJIC, R.; CLARK, S. O.; WILLIAMS, A. Intranasal IFN γ extends passive IgA antibody protection of mice against Mycobacterium tuberculosis lung infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 143, n. 3, p. 467–473, 2006.
- RILEY, R. L. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. **American review of tuberculosis**, v. 76, n. 6, p. 931–941, 1957.
- RISNES, K. R. et al. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 3, p. 310–318, 1 fev. 2011.
- ROSSMAN, M. D.; MACGREGOR, R. R. Tuberculosis: Clinical Management and New Challenges. McGraw-Hill, Health Professions Division. Universidade de Michigan, 1995.
- SCHWANDER S, DHEDA K. Human lung immunity against Mycobacterium tuberculosis: insights into pathogenesis and protection. **Am J Respir Crit Care Med** v. 183, p. 696 –707, 2011.
- SHIMONO, N. et al. Hypervirulent mutant of Mycobacterium tuberculosis resulting from disruption of the mce1 operon. **PNAS**, v. 100, p. 15918–15923, 2003.
- SILVA, V. M. C. et al. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. **INT J TUBERC LUNG DIS**, v. 7, n. 5, p. 478-484, 2003.
- SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56–64, 6 jul. 2016.
- STEBEGG, M. et al. Regulation of the germinal center response. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2469, p. 1-13, 2018.
- STEINGART, K. R. et al. Commercial Serological Tests for the Diagnosis of Active Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS Medicine**, v. 8, n. 8, 2011.
- STEINGART, K. R. et al. Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: Relevance for India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 5, p. 695–702, 2012.
- STRESSMANN, F. A. et al. Analysis of the bacterial communities present in lungs of patients with cystic fibrosis from American and British centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 281–291, jan. 2011.
- SWETS, J. A. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. **Science**, v. 240, p. 1285–1293, 1988.

SZE, M. A. et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 10, p. 1073–1080, 15 maio 2012.

TAKENAMI, I. et al. Serum antiphospholipid antibody levels as biomarkers for diagnosis of pulmonary tuberculosis patients. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 9, p. 1063–1070, 2018.

TAYLOR, J. J.; PAPE, K. A.; JENKINS, M. K. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 3, p. 597–606, 12 mar. 2012.

THERON, G. et al. Do adjunct tuberculosis tests, when combined with Xpert MTB/RIF, improve accuracy and the cost of diagnosis in a resource-poor setting? **European Respiratory Journal**, v. 40, n. 1, p. 161–168, 2012.

TOGUN, T. O. et al. Biomarkers for diagnosis of childhood tuberculosis: A systematic review. **Plos One**, p. 1–19, 2018.

UCHIDA, Y. et al. Accelerated immunopathological response of mice infected with Mycobacterium tuberculosis disrupted in the mce1 operon negative transcriptional regulator. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1275–1283, 2007.

ULRICHS, T. et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. **Journal of Pathology**, v. 204, n. 2, p. 217–228, out. 2004.

VAN MEER, G.; VOELKER, D.; FEIGENSON, G. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature**, v. 9, p. 112–124, 2008.

VELAGAPUDI, V. R. et al. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 5, p. 1101–1112, 1 maio 2010.

VENKATARAMAN, A. et al. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. **mBio**, v. 6, n. 1, 20 jan. 2015.

WELLS, W. F. On air-borne infection: Study II. Droplets and droplet nuclei. **American Journal of Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 611–618, 1934.

WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 10, p. 1260–1272, 1 out. 2017.

XU, J., CHEN, J., CHEN, D. Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of Mycobacterium tuberculosis composed of the 10-kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 4, p. 536–544, 2012.

WHO. Global Tuberculosis Report 2021. Geneva. World Health Organization.

ZHANG, T. et al. The role of glycosphingolipids in immune cell functions. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, 2019.

ZHANG, X. et al. Generation of Mycobacterium tuberculosis-specific recombinant antigens and evaluation of the clinical value of antibody detection for serological diagnosis of pulmonary tuberculosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 3, p. 751–757, mar. 2013.