



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Amanda Alcântara de Figueiredo

Análise do potencial diagnóstico do antígeno CFP-10 expresso  
pelo *M. tuberculosis*

Uberaba – MG  
2010



AMANDA ALCÂNTARA DE FIGUEIREDO

Análise do potencial diagnóstico do antígeno CFP-10 expresso  
pelo *M. tuberculosis*

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências Fisiológicas,  
Instituto de Ciências Biológicas e Naturais  
da Universidade Federal do Triângulo  
Mineiro, como requisito para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências Fisiológicas.  
Área de Concentração: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

AMANDA ALCÂNTARA DE FIGUEIREDO

ANÁLISE DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DO ANTÍGENO CFP-10  
EXPRESSO PELO *M. TUBERCULOSIS*

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

**Mestre em Ciências Fisiológicas**

e aprovada na sua versão final em ..... de ..... de 2010, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia.

---

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva  
- Coordenador do Programa –

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Virmondes Rodrigues Jr.  
- Presidente -

---

Dr<sup>a</sup>. Cristina Hueb Barata Ribeiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
- Membro -

---

Dr<sup>a</sup>. Alexandrina Sartori  
UNESP- Botucatu  
- Membro -

Dedico aos meus pais, José Alexandre e Cátia, pelo amor e apoio incondicionais e por terem me proporcionado condições para que eu alcançasse os meus objetivos.

Ao meu esposo, Carlos, pelo amor, companheirismo e força nos momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por tantas bênçãos recebidas e por saber que ele está sempre comigo.

Ao meu orientador, prof. Dr. Virmondes Rodrigues Jr, não só pelo exemplo de vida profissional, mas também pela paciência, dedicação, confiança e pelos seus ensinamentos.

Aos meus pais, José Alexandre e Cátia, pelo amor, incentivo, cuidado e apoio. Por terem me educado e proporcionado condições para que eu alcançasse meus objetivos, acreditasse nos meus sonhos e nunca desistisse.

Ao meu irmão, Júnior, pelo amor, apoio e pela verdadeira amizade.

Ao meu esposo, Carlos, pelo amor, apoio em todos os momentos, companheirismo e compreensão pelos momentos que precisei estar ausente.

À prof<sup>a</sup>. Edna Valim pela disponibilidade e colaboração.

Às enfermeiras Patrícia e Ângela do Posto de Saúde Eurico Vilela pelo profissionalismo e colaboração.

Ao meu colega de laboratório Marcos Vinícius pela colaboração e companhia no período de busca aos pacientes e durante os procedimentos laboratoriais.

Aos amigos do laboratório de imunologia: Beatriz Coutinho, Betânia Ribeiro, Betânea Peghini, Carlos Mota, Carla Sandrina, Cláudia Renata, prof<sup>a</sup>. Cristina Ribeiro, Cristina Wide, Francielle, Jéssica, Juliana Machado, Karine Rezende, Lilian Borges, Mauricio Llaguno, Mônica Sawan, Monique Fonseca, Patrícia Reis, Paula, Polyanna Miranda, Rafael Faria, Taciana Cristina, Thaís Farnesi, Thiago Costa, Vanessa Beatriz, pelo ótimo convívio e pelas trocas de experiências.

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho.

Muito obrigada.

Figueiredo AA de. Análise do potencial diagnóstico do antígeno CFP-10 expresso pelo *M. tuberculosis* [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2010.

## RESUMO

A utilização de antígenos específicos do *M. tuberculosis* é de extrema importância para o diagnóstico precoce da tuberculose e para o controle da propagação da micobactéria na população. O CFP-10 é um antígeno que está presente no *M. tuberculosis*, porém está ausente no *M. bovis* da BCG e nas micobactérias ambientais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a resposta imune contra o antígeno recombinante CFP-10 do *M. tuberculosis* é capaz de diferenciar a imunidade desenvolvida pela vacina BCG daquela devido à infecção pela micobactéria. Para isto, foi analisada a resposta imune celular de 18 pacientes com TB ativa, 16 pacientes tratados e 19 indivíduos saudáveis PPD-positivo. A resposta imune celular foi analisada através de cultura de PBMC para ensaios de proliferação celular e produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-13) e a citocina reguladora IL-10 frente aos estímulos de PHA, BCG e CFP-10. Foi possível observar um aumento significativo na resposta proliferativa das células após cultivo com PHA entre os indivíduos tratados e os saudáveis quando comparados aos pacientes ativos. A comparação dos índices de proliferação entre os três grupos frente ao BCG e ao antígeno CFP-10 não foi estatisticamente significativa. Em relação aos níveis plasmáticos das citocinas, os níveis de IFN- $\gamma$  mostraram-se significativamente mais elevados nos pacientes com TB ativa em relação aos pacientes tratados e aos indivíduos saudáveis. Os níveis plasmáticos de IL-13 foram significativamente maiores entre os pacientes com TB ativa em relação aos indivíduos saudáveis. Os níveis plasmáticos de IL-10 foram significativamente maiores entre os pacientes com doença ativa em relação aos pacientes tratados. Já em relação ao TNF- $\alpha$  e à IL-4, não foram detectadas diferenças nos níveis plasmáticos entre os três grupos. Em relação à produção das citocinas nos sobrenadantes de cultura, houve produção significativamente maior de IFN- $\gamma$  frente ao BCG entre os indivíduos saudáveis quando comparados aos pacientes ativos e tratados. A produção de IL-4 foi significativamente maior entre os pacientes com TB ativa em relação aos indivíduos saudáveis nos sobrenadantes de culturas sem estímulo e após os estímulos com BCG e CFP-10. Já a produção de IL-4 após o estímulo de PHA foi significativamente maior entre os pacientes ativos e tratados quando comparados aos indivíduos saudáveis. A produção de IL-13 foi significativamente maior nos grupos dos pacientes ativos e tratados em relação aos indivíduos saudáveis após estímulo com PHA. Em relação à produção de IL-10, foi significativamente maior nos grupos dos indivíduos saudáveis e dos pacientes tratados quando comparados aos pacientes com TB ativa nas culturas sem estímulo e após estímulo com PHA. Frente ao antígeno CFP-10, houve uma maior produção de IL-10 entre os indivíduos saudáveis, sendo a diferença significativa apenas em relação aos pacientes ativos. Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de TNF- $\alpha$  frente aos estímulos entre os três grupos de participantes. Portanto, entre os pacientes ativos foi possível observar um significativo viés Th2, em detrimento de uma resposta Th1 protetora. Não foi possível observar um grande potencial do CFP-10 em induzir produção de IFN- $\gamma$  nos pacientes com tuberculose ativa. Pelo contrário, citocinas de padrão Th2 (IL-4 e IL-13) mostraram-se potencialmente mais promissoras para diferenciar os pacientes doentes daqueles saudáveis ou tratados. Os dados, especialmente o balanço IL-10/IFN- $\gamma$ , apontam para a existência de um complexo modelo de imunorregulação entre os pacientes com tuberculose.

Palavras-chave: Tuberculose, CFP-10, Citocinas, Proliferação celular.

Figueiredo AA de. Análise do potencial diagnóstico do antígeno CFP-10 expresso pelo *M. tuberculosis*./ Immunodiagnosis potential of *M. tuberculosis* CFP-10 for active tuberculosis [dissertação]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2010.

### ABSTRACT

The use of specific antigens of *M. tuberculosis* is extremely important for early diagnosis of tuberculosis and to control the spread of mycobacteria in the population. The CFP-10 is an antigen that is present in *M. tuberculosis*, but is absent in *M. bovis* of BCG and environmental mycobacteria. So, the objective of this study was to determine whether the immune response to recombinant CFP-10 of the *M. tuberculosis* is able to differentiate the immunity developed by the BCG vaccine that due to infection by mycobacteria. For this, we analyzed the cellular immune response of 18 patients with active TB, 16 treated patients and 19 healthy PPD-positive. The cellular immune response was analyzed by culture of PBMC for assays of cell proliferation and production of Th1 cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-13) and the regulatory cytokine IL-10 to PHA, BCG and CFP-10. It was possible to observe a significant increase in proliferative response of cells after culture with PHA among treated and healthy participants compared to active patients. Comparison of the proliferation index among the three groups to the BCG and CFP-10 antigen was not statistically significant. In relation to plasma levels of cytokines, IFN- $\gamma$  was significantly higher in patients with active TB compared to treated patients and healthy subjects. Plasma levels of IL-13 were significantly higher among patients with active TB compared to healthy subjects. Plasma levels of IL-10 were significantly higher among patients with active disease compared to treated patients. In relation to TNF- $\alpha$  and IL-4, no differences were found in plasma levels among the three groups. For the production of cytokines in culture supernatants, there was a significantly higher production of IFN- $\gamma$  to BCG among healthy individuals when compared to active and treated patients. The production of IL-4 was significantly higher among patients with active TB compared to healthy subjects in the supernatants of cultures without stimulation and after stimulation with BCG and CFP-10. The production of IL-4 after stimulation of PHA was significantly higher in patients with active and treated TB when compared to healthy subjects. The production of IL-13 was significantly higher in treated and active patients compared with healthy individuals after stimulation with PHA. For the production of IL-10, it was significantly higher in the healthy subjects and patients treated when compared to patients with active TB in cultures without stimulation and after stimulation with PHA. With the CFP-10 antigen, there was a greater production of IL-10 among healthy subjects and the difference was significant only for active patients. There was no statistically significant difference in production of TNF- $\alpha$  with the stimuli among the three groups of participants. So among the active patients there was a significant bias Th2, rather than a protective Th1 response. It was not possible to observe a big potential of CFP-10 in inducing IFN- $\gamma$  production in patients with active tuberculosis. Otherwise, Th2 cytokines (IL-4 and IL-13) were potentially more promising for differentiating sick patients from those healthy or treated. The datas, specially the balance IL-10/IFN- $\gamma$ , show the existence of a complex model of immunoregulation in patients with tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis, CFP-10, Cytokines, Cell proliferation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Número de casos novos de TB.....	15
<b>Figura 2</b> – Comparação da resposta proliferativa de linfócitos frente a diferentes concentrações do antígeno CFP-10 entre paciente ativo e tratado .....	38
<b>Figura 3</b> – Resposta proliferativa, representada em índice de proliferação, de PBMC dos grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19), frente aos estímulos de PHA, BCG e CFP-10. ....	40
<b>Figura 4</b> – Comparação dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	41
<b>Figura 5</b> – Comparação dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	42
<b>Figura 6</b> – Comparação dos níveis plasmáticos de IL-4 entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	43
<b>Figura 7</b> – Comparação dos níveis plasmáticos de IL-13 entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	43
<b>Figura 8</b> – Comparação dos níveis plasmáticos de IL-10 entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	44
<b>Figura 9</b> – Produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). ....	45
<b>Figura 10</b> – Produção de TNF- $\alpha$ em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	46
<b>Figura 11</b> – Produção de IL-4 em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	47
<b>Figura 12</b> – Produção de IL-13 em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	48



<b>Figura 13</b> – Produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis. ....	49
<b>Figura 14</b> – Produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de PBMC nos grupos de pacientes com TB ativa e indivíduos tratados e saudáveis, sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10. ....	50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Esquemas de tratamento da TB e as drogas utilizadas. ....28
- Tabela 2** – Distribuição dos participantes do estudo de acordo com a idade e gênero...37
- Tabela 3** – Medianas dos índices de proliferação (IP), com seus respectivos valores mínimo e máximo, de PBMC dos grupos de participantes ativos, tratados e saudáveis frente aos diferentes estímulos.....39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Grau Celsius

% - Porcentagem

μl – Microlitro

μg – Micrograma

Ac-B – Anticorpo conjugado com biotina

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

APC – Célula apresentadora de antígeno

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BSA – Albumina de soro bovino

CD1 – Molécula de superfície celular designada pelo “grupo de diferenciação” 1

CFP-10 – culture filtrate protein-10

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

cpm - cintilação por minuto

CR – Receptores do complemento

DOTS – Tratamento Diretamente Observado

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESAT-6 – Early secreted antigenic target-6

FasL – Ligante de Fas

Fas – (CD 95) Receptor de superfície da família do receptor TNF

g - gravidade

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN-γ - Interferon gama

IL – Interleucina

IP – Índice de proliferação

Kb – quilo base

kDa – Quilo Dáton

mAb – monoclonal antibody

MBL – Lecitina ligadora de manose

MCP-1 – Proteína quimioatraente de monócito 1  
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade  
MIP-1 $\alpha$  – Proteína inflamatória do macrófago-1 alfa  
mL – Mililitro  
mm - Milímetro  
MR – Receptor de manose  
NF $\kappa$ B – Fator nuclear de transcrição kappa B  
NK – Células natural killer  
NLR – NOD-Like Receptor  
NO – Óxido nítrico  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPD – 1,2 ortofenilenodiamino  
PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos  
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico  
PBS – Solução salina tamponada com fosfato  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
pg – picogramas  
PHA - Fitohemaglutinina  
PNCT – Programa Nacional de Controle da Tuberculose  
PPD – Derivado protéico purificado  
PRR – Receptores de reconhecimento de padrões  
QFT-G – QuantiFeron-TB Gold  
RANTES – Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted  
RD – Região de diferença  
RNI – Reativos Intermediários de Nitrogênio  
ROI – Reativos Intermediários de Oxigênio  
RPMI – Roswell Park Memorial Institute  
TB – Tuberculose  
Th1 – Linfócito T helper (auxiliar) 1  
Th2 – Linfócito T helper (auxiliar) 2  
TLR – Toll-Like Receptor  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral-alfa  
UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1 Epidemiologia.....	13
1.2 O Agente Etiológico .....	15
1.3 Modo de Transmissão .....	16
1.4 Patogenia .....	17
1.5 Resposta Imune na Tuberculose .....	18
1.5.1 Imunidade Inata .....	18
1.5.2 Imunidade Adaptativa .....	20
1.6 A Doença .....	24
1.7 Diagnóstico .....	24
1.8 Terapêutica .....	27
1.9 Profilaxia .....	29
<b>2 Justificativa .....</b>	<b>30</b>
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo Geral .....	31
3.2 Objetivos Específicos .....	31
<b>4 Material e Métodos .....</b>	<b>32</b>
4.1 Pacientes e Controle .....	32
4.2 Cultura de células .....	32
4.3 Resposta Proliferativa de Linfócitos .....	33
4.4 Quantificação de Citocinas .....	34
4.5 Análise Estatística .....	36
<b>5 Resultados .....</b>	<b>37</b>
5.1 Proliferação de Linfócitos .....	37
5.2 Quantificação de Citocinas .....	41
<b>6 Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>7 Conclusões .....</b>	<b>59</b>
<b>Referências .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma patologia que acompanha o homem desde as civilizações mais antigas. Segundo registros, sejam em documentos encontrados ou estudos em múmias, a doença tem sido observada no passado dos povos de várias raças e nos diversos continentes. Tudo indica que seus riscos se ampliaram na proporção do adensamento das populações. A urbanização, com a decorrente aproximação e a convivência prolongada dos indivíduos, tem sido importante fator de multiplicação dessa doença <sup>(1)</sup>.

A TB já foi considerada uma doença terminal. Porém, hoje, com o avanço da terapia, essa doença já é praticamente curável, desde que o paciente siga de forma correta o tratamento.

Apesar da descoberta, há mais de 50 anos, de drogas efetivas para o tratamento da TB, há ainda muitos obstáculos para o controle da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, como o longo tratamento de 6 a 9 meses de duração, a resistência aos fármacos, a ausência de uma vacina altamente eficaz e o incompleto conhecimento sobre o controle da progressão da doença <sup>(2)</sup>. Outro grande obstáculo com que os clínicos se deparam é a falta de um teste diagnóstico rápido que seja sensível e específico suficiente para o diagnóstico precoce da doença.

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo *M. tuberculosis*. Em 2008 observou-se uma incidência de aproximadamente 9,4 milhões de casos de TB mundialmente, o equivalente a 139 casos por 100.000 habitantes. As maiores concentrações desses casos estão em alguns países da Ásia e da África, como Índia, China, Indonésia, Nigéria e África do Sul que são os cinco países que lideram o grupo dos 22 países com alta incidência de TB <sup>(3)</sup> (FIG. 1).

Ao longo das últimas décadas, ainda que as autoridades sanitárias tenham instituído esforços para o controle da TB, seja através da identificação (baseados na detecção) de casos novos, tratamento precoce dos doentes, quimioprevenção dos infectados sob risco de adoecer e ampla difusão da vacina BCG <sup>(4)</sup>, o *M. tuberculosis* continua sendo uma das

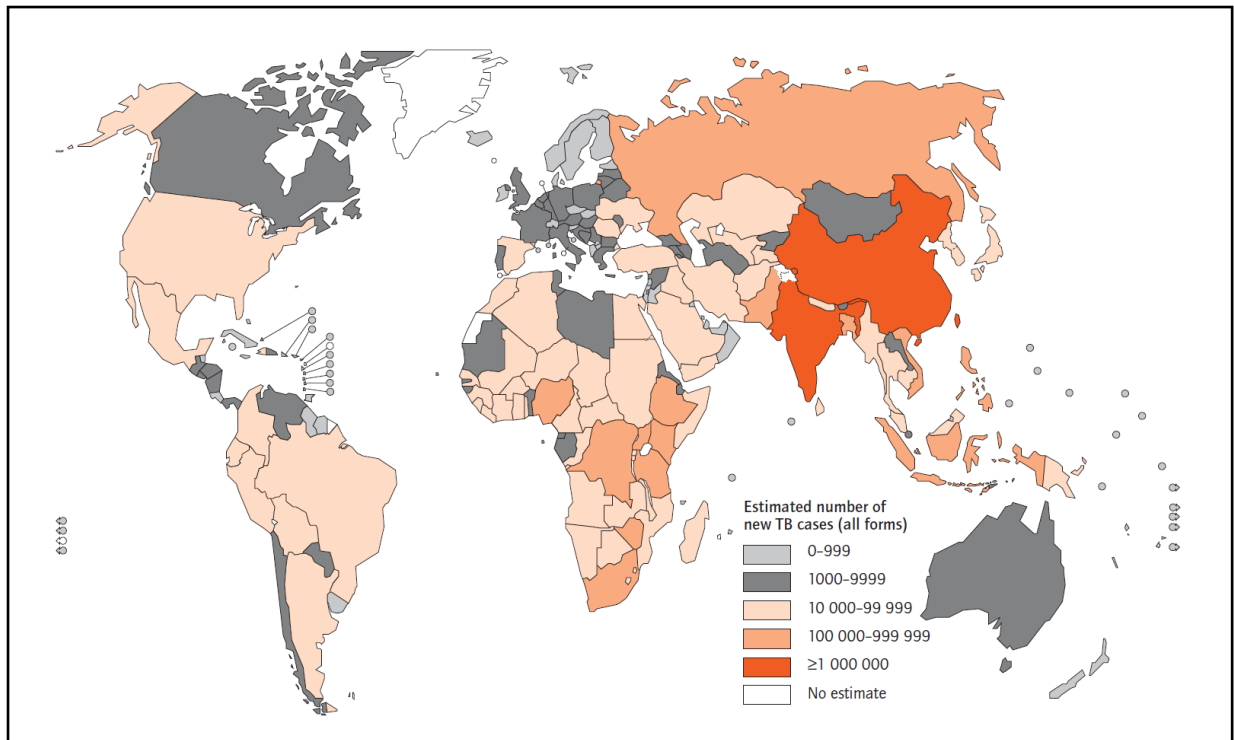
---

ameaças mais sérias para a saúde pública, responsável por pelo menos 1,3 milhões de mortes por ano em todo o mundo <sup>(3)</sup>. Uma situação particular relacionada com a infecção pelo *M. tuberculosis* é a co-infecção com o vírus HIV. A TB é responsável pela morte de mais de um terço das pessoas infectadas pelo HIV <sup>(5)</sup> e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), de 9,3 milhões de casos novos de TB que ocorreram no mundo em 2007, 1,37 milhões (15%) eram co-infectados com HIV. A África Sub-Saariana representou aproximadamente 79% dessas co-infecções, seguido pelo sudeste asiático, com 11% <sup>(3)</sup>.

A propagação do vírus da AIDS e o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* multidroga-resistentes têm aumentado o impacto dessa doença no mundo.

Alguns estudos têm apontado como causa da propagação e virulência da TB e da epidemia do HIV na África a alta incidência de infecções parasitárias, em geral, e particularmente infecções por helmintos. Nessas situações a resposta mediada por células é predominantemente do tipo Th2 <sup>(6)</sup>.

No Brasil, a TB é considerada a 4ª causa de mortes por doenças infecciosas e a 1ª entre os pacientes com AIDS. A incidência de TB varia de acordo com a região, sendo que as maiores taxas são observadas nas regiões norte e sudeste. Cerca de 80 mil novos casos da doença (incidência de 39 casos por 100 mil habitantes) e aproximadamente 5 mil mortes por ano são registrados, o que coloca o Brasil em 14º lugar entre as 22 nações com alta prevalência da doença <sup>(3,7)</sup> (FIG. 1).



**FIGURA 1:** Número de casos novos de TB.

Fonte: WHO, 2009.

A distribuição geográfica da TB, por todo o mundo, parece estar relacionada às condições socioeconômicas locais <sup>(8)</sup>, sendo que cerca de 95% de todos os casos ocorre em países em desenvolvimento <sup>(9)</sup>. Na maioria dos países desenvolvidos, o risco de infecção pelo *M. tuberculosis* é da ordem de 0,1 a 0,3%, enquanto que em países com condições mais precárias a taxa alcança 2,5%. No Brasil como um todo, o risco é de 0,5% <sup>(10)</sup>.

## 1.2 O AGENTE ETIOLÓGICO

A TB é uma doença endêmica infecto-contagiosa causada por microorganismos que pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, ao gênero *Mycobacterium* e ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Esse complexo inclui o *M. tuberculosis*, agente causador da TB em humanos, o *M. bovis*, que causa TB em mamíferos incluindo bovinos e humanos, o *M. africanum*, que provoca mais casos de TB que o *M. tuberculosis* em partes da África, o *M. microti*, que infecta ratos silvestres, mas não é



virulento em humanos e camundongos, o *M. canettii*, o qual raramente está associado à infecção <sup>(11)</sup> e, recentemente, o *M. caprae*, agente causador da TB em caprinos <sup>(12)</sup>.

Essas micobactérias apresentam como característica principal o fato de serem bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Essa característica designa bactérias que resistem à descoloração com álcool acidificado quando coradas à quente com fucsina fenicada e dessa forma apresentam coloração avermelhada (técnica de Ziehl-Neelsen), quando observadas em esfregaços ao microscópio óptico. Essa propriedade se deve principalmente às características dos lipídeos que compõem a parede celular dessas bactérias <sup>(13)</sup>.

O *M. tuberculosis*, sendo o principal agente causador da TB no homem, foi isolado e identificado, pela primeira vez, como agente etiológico da TB, por Robert Koch, em 1882, passando a ser conhecido também como bacilo de Koch. Esse bacilo apresenta um comprimento de 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$ . Caracteriza-se por ser um patógeno intracelular facultativo devido a sua capacidade de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos, apresenta crescimento lento e é aeróbio estrito <sup>(14)</sup>.

### 1.3 MODO DE TRANSMISSÃO

O *M. tuberculosis* é transmitido a partir da sua eliminação em gotículas de saliva através de tosses ou espirros de indivíduos com a forma pulmonar da TB. Essas gotículas podem permanecer em suspensão por vários dias, em condições favoráveis, e uma vez aspiradas, as partículas infectantes maiores são removidas pelo sistema mucociliar do trato respiratório superior e as partículas menores podem alcançar os alvéolos pulmonares.

A transmissão do *M. tuberculosis* e o resultado da infecção dependem de vários fatores que vão determinar a interação bacilo – hospedeiro, entre eles a virulência da cepa infectante, o número de partículas inaladas e, principalmente, a integridade do sistema imunológico do hospedeiro especialmente do setor mediado por células - macrófagos e linfócitos T e, ainda, da eficiência dos mecanismos efetores desencadeados a partir da ativação destas células <sup>(1,9)</sup>.

A chance de adquirir a infecção aumenta em famílias de baixa renda, que moram em casas mal ventiladas e pequenas e que têm contato próximo e prolongado com pelo menos um adulto tuberculoso <sup>(9)</sup>.

## 1.4 PATOGENIA

O sucesso da infecção pelo *M. tuberculosis* é devido à habilidade que esta micobactéria tem de, após sofrer fagocitose, persistir no interior de macrófagos e se proliferar, escapando dos mecanismos anti-microbianos dessas células, através de seus mecanismos de evasão <sup>(15)</sup> e estabelecendo uma infecção que pode se manifestar como uma doença aguda ou crônica ou, ainda, ser assintomática com possibilidade de ativação posteriormente <sup>(11)</sup>. Esses mecanismos de evasão representam um papel importante na patogênese da micobactéria <sup>(16)</sup>.

Após a inalação dos bacilos ocorre a formação do complexo primário da TB caracterizando a primoinfecção (infecção inicial) tuberculosa que ocorre em indivíduos sem imunidade específica, geralmente em crianças saudáveis e jovens que não tinham sido expostos ao *M. tuberculosis* anteriormente. A adolescência é a época de maior risco <sup>(17)</sup>.

Os bacilos multiplicam-se no interior de macrófagos levando à sua destruição e à progressão da reação inflamatória mononuclear, com a formação do foco pulmonar primário ou foco de Gohn. Células fagocíticas contendo os bacilos migram via drenagem linfática e chegam a linfonodos satélites da região atingida. Lá os bacilos continuam a multiplicar-se dentro de células fagocíticas, e ao lisá-las, provocam uma nova reação inflamatória, com conseqüente hiperplasia do linfonodo infectado. A esse conjunto de eventos (foco pulmonar, linfagite intermediária e foco ganglionar) denominou-se, então, complexo primário da TB <sup>(18,19)</sup>.

O resultado da infecção inicial pode variar de acordo com a cepa da micobactéria inalada e/ou o estado imunológico do indivíduo. Cerca de 10% dos indivíduos apresentam susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, conduzindo diretamente à TB primária, que ocorre dentro dos primeiros cinco anos após a infecção inicial, devido a uma falha na resposta adaptativa em controlar a replicação inicial da bactéria <sup>(20)</sup>. A maior parte dos indivíduos expostos desenvolve uma resposta imune eficaz permanecendo no período de latência da infecção (estabilização) <sup>(21,22)</sup>, sem cura bacteriológica, com a possibilidade de reativação e evolução para a TB secundária ou pós-primária. Pode ocorrer ainda a cura bacteriológica ou também a disseminação da micobactéria em diversos órgãos, produzindo uma TB miliar aguda ou lesões exsudativas similares a pneumonia ou meningite.

A TB secundária pode ser localizada, concentrando-se no órgão lesionado no período primário, ou disseminada, caracterizando uma TB miliar tardia <sup>(23,24)</sup>.

Indivíduos com TB latente, apesar de serem assintomáticos e não serem contagiosos representam um grande reservatório do *M. tuberculosis* e podem permanecer nessa fase por meses a anos ou mesmo a vida inteira. A reativação dessa infecção latente pode ocorrer por alteração da resposta imune, levando ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença. Algumas das causas associadas à reativação são: infecção pelo HIV, tratamento com drogas imunossupressoras como os corticosteróides, envelhecimento e abuso de álcool ou drogas ilícitas <sup>(9,25,26)</sup>.

## 1.5 RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE

O controle imunológico contra a infecção pelo *M. tuberculosis*, em indivíduos resistentes, é baseado na resposta imune celular (Th1), devido o organismo viver no interior de células, geralmente macrófagos <sup>(27,28)</sup>. Este tipo de resposta inclui a participação de macrófagos, linfócitos T CD4+, T CD8+ e  $\gamma\delta$ , além da produção de citocinas como Interleucina (IL)-2, Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-12, Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  e também quimiocinas como RANTES, proteína quimiotática de monócito (MCP)-1, proteína inflamatória do macrófago (MIP)-1 $\alpha$  e IL-8 que apresentam um papel muito importante na migração de diferentes subpopulações celulares ao sítio de infecção para a formação do granuloma <sup>(29,30)</sup>.

Mecanismos efetores tanto da imunidade inata quanto da adaptativa participam da defesa contra a TB.

### 1.5.1 Imunidade Inata

Células fagocitárias, como os macrófagos e as células dendríticas, que são os primeiros tipos celulares envolvidos na resposta imune inata, têm um papel crucial na iniciação e direção da imunidade adaptativa mediada por células T. As diferenças dos

resultados entre os indivíduos após a infecção com o *M. tuberculosis* pode ser em parte explicado pela eficiência dos vários mecanismos de defesa da imunidade inata<sup>(30)</sup>.

A TB inicia-se com a inalação de aerossóis contendo os bacilos. Já antes mesmo de atingir os pulmões, há o desencadeamento de uma defesa inespecífica por parte do organismo contra a instalação dessas micobactérias, representando a resposta imune inata do hospedeiro, constituída pelas barreiras físicas, como os pêlos nasais, o muco, o turbilhonamento aéreo nasal e a secreção traqueobrônquica. Porém, apenas um pequeno número de bacilos é preciso para entrar nos alvéolos dos pulmões humanos e estabelecer uma infecção<sup>(31)</sup>.

No interior dos pulmões, as primeiras células que são infectadas pelo *M. tuberculosis* e suporta o seu crescimento são os macrófagos alveolares que, juntamente com células dendríticas, respondem à infecção através do início de uma cascata inflamatória necessária para o extravasamento de leucócitos sanguíneos para o local da infecção<sup>(32,33)</sup>.

Essas células fagocitárias reconhecem e fagocitam a micobactéria através de seus receptores fagocíticos, como os receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4) que são responsáveis pela fagocitose do *M. tuberculosis* opsonizado<sup>(34)</sup>, o Receptor de manose (MR)<sup>(35)</sup>, os receptores “scavenger”<sup>(36)</sup> que são responsáveis pela fagocitose do *M. tuberculosis* não-opsonizado e outros. Além desses, os macrófagos e as células dendríticas também expressam outros tipos de receptores que exercem um importante papel no reconhecimento imune do *M. tuberculosis*, são os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Sabe-se que o *M. tuberculosis* pode ativar pelo menos duas famílias diferentes de PRRs, os receptores “Toll-like” (TLR)<sup>(37)</sup> e os receptores “NOD-like” (NLR)<sup>(38)</sup>.

Sabe-se que o *M. tuberculosis* pode atuar ativando o TLR2 e o TLR4, que interagem com diferentes componentes da bactéria. O TLR2 atua como um heterodímero juntamente com TLR1 ou TLR6 e é ativado por lipopeptídeos, enquanto que o TLR4 é ativado por lipopolissacarídeos. Essa ativação dos TLRs por ligantes específicos do *M. tuberculosis* inicia uma cascata de sinalização nas células fagocitárias que resulta na ativação do fator nuclear de transcrição kappaB (NFκB) levando à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias que são cruciais para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, além da maturação do fagossomo e da atividade antimicrobiana direta<sup>(39,40)</sup>. Assim, a ativação de TLRs constitui uma importante ligação entre a resposta celular inata e a subsequente ativação da resposta imune adaptativa contra o patógeno<sup>(41)</sup>.

O produto da fagocitose são os fagossomos. Estes, por sua vez, se fundem a lisossomos, que são organelas com potentes enzimas hidrolíticas que em pH ácido são capazes de degradar macromoléculas inteiras, incluindo microorganismos. O resultado dessa fusão forma o fagolisossomo, onde o microorganismo fagocitado é degradado pelas enzimas. Entretanto, essa função de degradação exercida pelo fagolisossomo encontra-se prejudicada na infecção pelo *M. tuberculosis*. Um dos mecanismos de evasão do *M. tuberculosis* da destruição pelos macrófagos é inibir essa fusão entre o fagossomo e o lisossomo através da liberação de enzimas e derivados micobacterianos e diminuir a potência das enzimas intralisossomais através da alcalinização do meio <sup>(42,43,44)</sup>.

Assim, esses microorganismos podem sobreviver e até se replicar dentro dos fagossomos, proporcionando uma fonte persistente de antígenos nos compartimentos vesiculares.

O *M. tuberculosis* pode interagir também com células não-fagocitárias, como as células epiteliais alveolares <sup>(45)</sup>, através de várias moléculas, como as proteínas surfactantes, as Lequitinas ligadoras de Manose (MBLs) e C1q. Essa interação seria uma alternativa para escapar das agressões do meio e dos poderes microbicidas dos macrófagos <sup>(46)</sup>. O aumento da ligação do *M. tuberculosis* a células epiteliais e/ou macrófagos alveolares pode representar um fator de risco para o desenvolvimento clínico da TB <sup>(30)</sup>.

As células “natural killers” (NK) também participam da resposta imune inata na defesa contra o *M. tuberculosis*. Essas células, além de ativarem macrófagos através da produção de IFN- $\gamma$  <sup>(47)</sup>, possuem grânulos citoplasmáticos contendo granulísina, uma proteína de 9kDa que altera diretamente a integridade da membrana da micobactéria, levando a sua morte <sup>(48,49)</sup>.

Na maioria dos indivíduos que são expostos ao *M. tuberculosis* a resposta imune inata não proporciona uma proteção eficaz contra a infecção, sendo necessário o envolvimento da resposta adaptativa para conter o crescimento da bactéria e promover a proteção <sup>(50)</sup>.

### 1.5.2 Imunidade Adaptativa

De acordo com estudos em relação à imunidade protetora anti-micobacteriana, a interação entre células T CD4+, macrófagos e células dendríticas é essencial para uma

resposta imune específica efetiva contra o *M. tuberculosis*, necessitando principalmente da secreção de citocinas do tipo Th1, tendo o IFN- $\gamma$  como a citocina principal. O resultado da infecção pelo *M. tuberculosis* depende, principalmente, do sucesso da interação entre essas células<sup>(27,51,52)</sup>.

O balanço entre o IFN- $\gamma$ , uma citocina Th1, e IL-4, uma citocina Th2 ou IL-10, uma citocina reguladora é a chave para a manutenção dessa resposta<sup>(53,54)</sup>.

As células dendríticas, no local da infecção, capturam o *M. tuberculosis* e seguem via sistema linfático até um linfonodo, onde, na região paracortical, apresentam antígenos do *M. tuberculosis* às células T naive que ali se encontram<sup>(55,56)</sup>.

Como o *M. tuberculosis* reside, principalmente, em vacúolos dentro de fagócitos, o resultado é a apresentação via MHC de classe II de seus antígenos para as células T CD4+ que agora ativadas migram para o local da infecção para desempenhar suas funções efetoras. Essas células são essenciais na resposta protetora contra esse patógeno<sup>(57,58)</sup>. Assim, o aumento de casos de infecções pelo HIV, que provoca uma diminuição dessas células T CD4+, tem aumentado a susceptibilidade à infecção aguda e também a reativação da TB<sup>(59)</sup>.

Duas a três semanas após a infecção, a imunidade mediada por células T se desenvolve. Linfócitos T antígeno-específicos, caracterizando a imunidade adaptativa, proliferam dentro das lesões e reconhecendo antígenos do *M. tuberculosis*, apresentados por macrófagos, passam a produzir IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que ativam os macrófagos a destruírem as micobactérias intracelulares<sup>(30,60)</sup> através da produção de Reativos Intermediários de Oxigênio (ROI) e Reativos Intermediários de Nitrogênio (RNI) como o óxido nítrico (NO)<sup>(61,62)</sup>, caracterizando seus efeitos micobactericidas, pois reagem com uma ampla variedade de moléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos.

Para neutralizar a ação dessas substâncias micobactericidas o *M. tuberculosis* utiliza uma variedade de moléculas para desintoxicar os ROIs e RNIs antes dos danos ou para reparar os danos por eles causados<sup>(63)</sup>.

Outra população de linfócitos que apresenta uma função importante na TB são os linfócitos T  $\gamma\delta$  (Gama-delta). Essas células tendem a se concentrar na superfície epitelial e podem ser consideradas a defesa inicial contra a invasão de patógenos, pois estão entre as primeiras células recrutadas para o local da lesão e também secretam citocinas e quimiocinas, importantes na resposta imune. Esses linfócitos representam aproximadamente cerca de 1 a 5% dos linfócitos T CD3+ e respondem a uma quantidade restrita de antígenos do *M. tuberculosis*, enquanto que os linfócitos T  $\alpha\beta$  (Alfa-beta) representam aproximadamente 95% e respondem a uma ampla variedade de antígenos. Porém, ambos os tipos de linfócitos são

igualmente citotóxicos aos macrófagos infectados pela micobactéria, produzindo grande quantidade de IFN- $\gamma$  <sup>(64,65)</sup>.

Recentemente, células T CD8+ específicas para antígenos do *M. tuberculosis* têm sido isoladas de pacientes infectados ou geradas por imunização. Elas migram para os pulmões de maneira similar às células T CD4+, depois da infecção <sup>(66)</sup>. Essas células, além de produzirem IFN- $\gamma$  para a ativação de macrófagos, provocam a lise de células infectadas através da produção de perforina e granzimas <sup>(48)</sup> e também a apoptose via interação de proteínas transmembrânicas Fas-FasL, conhecidas como receptores da morte, reduzindo, assim, o número de bactérias intracelulares <sup>(27)</sup>.

As células T CD8+ podem reconhecer antígenos micobacterianos ligados às moléculas de MHC de classe I ou às moléculas CD1 <sup>(67)</sup>. O mecanismo pelo qual proteínas micobacterianas têm acesso às moléculas de MHC classe I ainda não é muito entendido. Um estudo observou a formação de poros ou rupturas induzidos pela micobactéria na membrana vesicular que envolve o bacilo, permitindo a evasão de antígenos micobacterianos para o citoplasma da célula infectada <sup>(68)</sup>.

As moléculas CD1 são moléculas apresentadoras de antígenos, estruturalmente similares ao MHC, codificadas por genes não polimórficos e, diferentemente das moléculas de MHC classe I que apresentam peptídeos, apresentam lipídeos ou glicolipídeos às células T CD8+ mostrando que uma variedade de antígenos pode ser reconhecida por células T.

Dados sugerem que são necessárias mais pesquisas sobre o processamento e apresentação de antígenos da micobactéria às células T CD8+ para se entender a contribuição dessas células à proteção contra o *M. tuberculosis* <sup>(27)</sup>.

Após a proliferação dos linfócitos T antígeno-específicos no local da lesão e a ativação dos macrófagos para a destruição das micobactérias, ocorre o controle do crescimento bacteriano caracterizando a fase de latência que mantém o controle do bacilo persistente e também protege contra uma reinfecção, muito importante em áreas com altos níveis de transmissão do *M. tuberculosis* <sup>(31)</sup>. Portanto, a resposta imune, na maioria dos indivíduos, é capaz de prevenir a TB ativa, mas não elimina a infecção.

Especula-se que o *M. tuberculosis* permaneça no estado de latência no interior de granulomas maduros <sup>(69)</sup> que são estruturas concêntricas com o centro necrótico circundado por vários tipos celulares como macrófagos, células gigantes oriundas de macrófagos fusionados e linfócitos ativados. As células Th2 parecem participar juntamente com as células Th1, talvez regulando sua atividade e evitando lesões tissulares disseminadas <sup>(70,71)</sup>. O centro dessas estruturas sofre um processo denominado necrose caseosa, apresentando morte de

células provavelmente devido a uma combinação de falta de oxigênio e efeitos citotóxicos dos macrófagos ativados, formando um tecido necrosado.

Portanto, dentro desses granulomas, os macrófagos infectados (e outras APCs) estariam sendo ativados diretamente pelas células T, particularmente através da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  <sup>(72)</sup>.

Na TB, o granuloma é um micro-ambiente essencial, no qual a resposta de células T do hospedeiro controla a proliferação da micobactéria no interior de macrófagos. Porém, ao mesmo tempo, o granuloma apresenta um potencial para ocasionar danos teciduais através da necrose caseosa e fibrose <sup>(73)</sup>.

Citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 e as quimiocinas, produzidas por macrófagos, células endoteliais estimuladas por produtos microbianos e linfócitos T são responsáveis pela migração de células inflamatórias para os locais de infecção, constituindo o granuloma <sup>(74,75,76)</sup>, limitando, assim, a multiplicação do *M. tuberculosis* e a progressão para doença <sup>(9)</sup>. Em caso de imunossupressão, essas barreiras enfraquecem, o bacilo retoma seu crescimento e expansão, resultando na doença ativa <sup>(39)</sup>.

O TNF- $\alpha$  é essencial para uma resposta efetiva contra o *M. tuberculosis* e para a formação eficiente do granuloma <sup>(77)</sup>. Por isso, em um estudo camundongos deficientes em TNF- $\alpha$  infectados pelo *M. tuberculosis* demonstraram uma progressão mais rápida da doença <sup>(78)</sup>.

A resposta Th1, caracterizada pela imunidade celular e produção principalmente de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , tem um papel importante nas defesas humanas contra a micobactéria. Já a resposta do tipo Th2, que representa a imunidade humoral, caracterizada pelas citocinas IL-4, IL-13 e IL-5, pode inibir as respostas imunes através da inibição de macrófagos e da redução da proliferação das células T <sup>(79)</sup>. Há também citocinas reguladoras, como a IL-10, que também inibem as ações de citocinas Th1. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica que é produzida por muitos tipos de células, incluindo as células T CD4+ e T CD8+, subtipos de células T reguladoras, monócitos, queratinócitos, macrófagos alternativamente ativados, células dendríticas e células B <sup>(80,81)</sup>. Seu papel na regulação da resposta imune na TB em humanos inclui a desativação de macrófagos, a inibição da proliferação de células T e a supressão da síntese de citocinas Th1 pró-inflamatórias <sup>(30)</sup>.

O balanço da produção de citocinas inibitórias e estimuladoras no ambiente local pode modular o efeito protetor contra a micobactéria, levando ao controle do crescimento e destruição do *M. tuberculosis*. No entanto, na TB, ocorrendo um predomínio de citocinas Th2



e/ou citocinas reguladoras ou uma depressão da resposta Th1 poderá caracterizar a supressão da resposta protetora contra o patógeno e consequente desenvolvimento de doença <sup>(82)</sup>.

## 1.6 A DOENÇA

Quando a TB ativa se desenvolve, a localização, a severidade e resultado da doença são altamente variáveis, refletindo o balanço entre o bacilo e os mecanismos de defesa do indivíduo.

O curso e o padrão da doença são altamente variáveis, podendo ser clinicamente assintomática, apresentar uma rápida progressão pulmonar ou se apresentar na forma disseminada. Essa variabilidade pode ser resultado das diferenças na susceptibilidade à doença entre os indivíduos, das diferentes respostas imunes inatas e adaptativas montadas por parte do hospedeiro e também da virulência que é variável entre as cepas da micobactéria <sup>(83)</sup>.

As manifestações clínicas da TB pulmonar podem ser variadas. Os sintomas mais comuns são: febre moderada e predominantemente vespertina, perda de peso, adinamia, tosse produtiva, de evolução arrastada, podendo apresentar até episódios de hemoptise. A sintomatologia da TB extrapulmonar dependerá do órgão ou sistema acometido, e é determinada por fenômenos inflamatórios ou obstrutivos <sup>(1)</sup>.

A TB pode se desenvolver em qualquer órgão do corpo, como em gânglios do sistema linfático, no sistema nervoso central, nos rins e nos ossos, mas normalmente e em indivíduos imunocompetentes se apresenta como infecção pulmonar, enquanto que em imunocomprometidos a doença pode acometer múltiplos órgãos <sup>(84)</sup>. A TB miliar, caracterizada pela disseminação hematogênica de um grande número de micobactérias pelo corpo, é a mais séria manifestação extrapulmonar da doença <sup>(30)</sup>.

## 1.7 DIAGNÓSTICO

Devido à principal via de transmissão do *M. tuberculosis*, o diagnóstico precoce da TB é essencial para o controle da propagação da micobactéria na população.

O teste diagnóstico ideal para a TB deveria ser capaz de detectar cedo a doença, ter alta sensibilidade e especificidade, deveria produzir resultados rapidamente, ter um baixo custo e causar pouco ou nenhum desconforto ao paciente.

O diagnóstico presuntivo da TB pulmonar faz-se através de dados da história clínica e achados radiológicos do paciente. A confirmação do diagnóstico é obtida através da baciloscopia ou esfregaço de escarro, que identifica os BAAR, e/ou cultura microbiológica. A baciloscopia é um método diagnóstico simples, rápido e com baixo custo eleito pelos serviços de saúde pública, porém tem como principal desvantagem o fato de ser negativa em 30 a 50% dos casos de pessoas infectadas com o *M. tuberculosis*, em parte devido à necessidade da presença de pelo menos 5000 bacilos/ml de escarro, apresentando uma baixa sensibilidade. A cultura microbiológica, geralmente empregada em casos pulmonares suspeitos e negativos à baciloscopia, tem a vantagem de permitir a detecção e o isolamento da micobactéria, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado e a determinação da sensibilidade do microorganismo aos quimioterápicos para TB. Os principais meios de cultura utilizados são o de Lowenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo), e o Middlebrook (sólido ou líquido, à base de agar). Essa técnica tem alta sensibilidade, mas a reprodução do bacilo é lenta, atrasando o diagnóstico em 4 a 8 semanas, o que pode representar um grande impacto no controle da endemia, pois o diagnóstico precoce interrompe o ciclo de transmissão da doença <sup>(85,86)</sup>.

A prova tuberculínica é um exame complementar que pode ser utilizado e é indicado como método de triagem para o diagnóstico de TB. Baseia-se na reação celular desenvolvida após a inoculação intradérmica de um derivado protéico purificado (PPD) do *M. tuberculosis*, que consiste em um preparado com vários antígenos diferentes da micobactéria. Quando positiva indica infecção prévia pelo *M. tuberculosis*, não permitindo distinguir o indivíduo infectado do doente <sup>(85)</sup>.

O diagnóstico de infecção pelo *M. tuberculosis* em países tropicais e endêmicos para TB apresenta-se como um desafio. A exposição ou infecção por outras micobactérias que compartilham os mesmos antígenos ou que apresentam reação antigênica cruzada <sup>(87,88)</sup>, a presença de infecções latentes <sup>(89)</sup> e a vacinação com a BCG <sup>(90)</sup> faz com que o teste utilizando o PPD, que continua sendo utilizado pelos serviços de saúde, não seja adequado como método diagnóstico, pois, nesses casos a probabilidade de resultados falso-positivos é alta.

Atualmente, alguns métodos imunológicos *in vitro* têm sido desenvolvidos para o melhoramento do diagnóstico da infecção e doença pelo *M. tuberculosis*, especialmente em indivíduos previamente vacinados. É o caso da nova técnica denominada “QuantiFERON-TB Gold” (QFT-G), que se baseia na dosagem de IFN- $\gamma$  pelo Ensaio de Imunoabsorção

Enzimática (ELISA) após a incubação do sangue total com antígenos específicos (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) da micobactéria <sup>(91)</sup> e também a técnica de ELISPOT, que se baseia na contagem de células T antígeno-específicas, derivadas do sangue periférico, secretoras de IFN- $\gamma$  <sup>(92)</sup>.

Além desses, há também os métodos diagnósticos sorológicos, que se baseiam em reações do tipo antígeno-anticorpo. Existem várias técnicas sorológicas para o diagnóstico de TB, como a hemaglutinação, a fluorescência indireta, radioimunoensaio, a aglutinação em látex e imunofluorescência. O ELISA tem chamado atenção pelo fato de ser um método de fácil realização, rápido e de possível aplicação nas formas de TB em que a baciloscopia apresenta limitações, como as formas pulmonares paucibacilares e as formas extrapulmonares. Porém, esses métodos apresentam alguns fatores limitantes, como: o tipo de antígeno empregado, a classe de imunoglobulina pesquisada, a população estudada (prevalência de infecções), situação imunológica e outros <sup>(93,94)</sup>.

Métodos de biologia molecular surgiram como promissores instrumentos para o diagnóstico da TB. As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, tendo com alvo sequências específicas de microorganismos, compreendem as seguintes alternativas: reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação mediada por transcrição, amplificação por deslocamento de fita e reação em cadeia da ligase. Apesar de apresentarem, em média, elevadas sensibilidade (95%) e especificidade (98%) em amostras com baciloscopia positiva, o seu rendimento diagnóstico é inferior nas amostras com baciloscopia negativa <sup>(85)</sup>.

Os exames de imagem são considerados métodos auxiliares no diagnóstico de TB, sendo a radiografia de tórax o método mais simples e econômico, no qual pode se observar alterações sugestivas da doença pulmonar <sup>(95)</sup>. No Brasil, cerca de 26,7% dos pacientes são tratados sem confirmação para TB pulmonar, com base apenas no quadro clínico-radiológico <sup>(86)</sup>.

O desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos para a detecção da TB no estágio precoce permitindo a interrupção da transmissão do *M. tuberculosis* é uma das metas do Programa Nacional de Controle da TB (PNCT) <sup>(96)</sup>, com o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade mundial provocadas por essa patologia.

O atual sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* e de outras espécies de micobactérias juntamente com a genômica comparativa está permitindo a identificação de genes que codificam antígenos espécie-específicos com potencial diagnóstico <sup>(97)</sup>.

Comparações dos genomas das espécies virulentas do *M. tuberculosis* e *M. bovis* com as cepas atenuadas do *M. bovis* da vacina BCG resultou na identificação de regiões

gênicas que estão ausentes na BCG, denominadas regiões de diferença (RD1 – RD16) <sup>(98,99,100)</sup>. Uma dessas regiões, denominada RD1, um segmento de DNA de aproximadamente 9.5-kb presente no *M. tuberculosis*, foi deletada durante a primeira atenuação do *M. bovis*, entre 1908 e 1921 <sup>(98)</sup> e está ausente em todas as cepas da BCG utilizadas no mundo atualmente como vacina contra a TB <sup>(101)</sup>, *M. avium* e outras micobactérias que não pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (com exceção do *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*) <sup>(102)</sup>. Mahairas e colaboradores (1996) observaram que os genes encontrados nessa região gênica RD1 apresentavam um importante papel na virulência da micobactéria <sup>(98)</sup>.

Outras deleções surgiram após 1921, durante o processo de atenuação do *M. bovis*. A região RD2, por exemplo, sofreu deleção durante a atenuação entre 1927 e 1931 <sup>(99)</sup>.

Dois genes (Rv3875 e Rv3874) presentes na região RD1 codificam duas proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis*, ESAT-6 (early secreted antigenic target-6) e CFP-10 (culture filtrate protein-10), que tem sido muito estudadas para sua utilização em testes diagnósticos mais específicos para a TB. Esses genes apresentam massas moleculares similares, compartilham o mesmo RNA mensageiro, apresentando um mesmo promotor <sup>(103)</sup>.

O CFP-10 e o ESAT-6 são proteínas secretadas precocemente no filtrado de cultura do *M. tuberculosis* <sup>(104,105)</sup>. Ambos os antígenos estimulam as células T a produzirem IFN- $\gamma$ , uma citocina Th1 e a apresentarem atividade citolítica em animais e humanos <sup>(106,107)</sup>. E assim como o ESAT-6 <sup>(102)</sup>, o antígeno CFP-10 está presente no *M. tuberculosis* e no *M. bovis* virulento e está ausente no *M. bovis* da BCG e nas micobactérias ambientais <sup>(98,99)</sup>. Isso faz com que essas proteínas sejam candidatas a participarem de testes diagnósticos mais específicos e também no desenvolvimento de vacinas mais eficazes para a TB.

## 1.8 TERAPÊUTICA

A TB é uma doença grave, porém curável em praticamente 100% dos casos novos, desde que diagnosticados e tratados adequadamente. O tratamento básico atualmente preconizado tem duração de seis meses e é dividido em 2 fases, já que a micobactéria tende a ser relativamente resistente a antibióticos, apresentar crescimento lento e o fenômeno de dormência. A fase inicial ou de ataque, consiste na associação de drogas com o objetivo de reduzir rápida e drasticamente a população bacilar e a proporção de mutantes resistentes. A fase seguinte é a fase de manutenção que tem como objetivo a eliminação dos

microorganismos persistentes e a prevenção de recaídas e recidivas <sup>(1)</sup>. A tabela 1 apresenta os esquemas de tratamento de TB com as respectivas drogas utilizadas atualmente.

**Tabela 1.** Esquemas de tratamento da TB e as drogas utilizadas.

Esquema I (Esquema Básico)		Esquema IR (Esquema I Reforçado)		Esquema II (TB meningocéfálica)		Esquema III (Falência do I e IR)	
1ª Fase (2 meses)	2ª Fase (4 meses)	1ª Fase (2 meses)	2ª Fase (4 meses)	1ª Fase (2 meses)	2ª Fase (7 meses)	1ª Fase (3 meses)	2ª Fase (9 meses)
R H Z	R H	R H Z E	R H E	R H Z	R H	S Z E Et	E Et

Adaptado de: Brasil. Ministério da Saúde (2005)

Notas: R= Rifampicina; H= Isoniazida; Z= Pirazinamida; E= Etambutol; S= Estreptomicina; Et= Etionamida

O tratamento da TB no Brasil segue uma estratégia recomendada pela OMS, denominada DOTS (“Directly Observed Treatment”) que significa Tratamento Diretamente Observado, uma proposta de intervenção que aumenta a probabilidade de cura dos doentes em função da garantia do tratamento assistido, contribuindo para a interrupção da transmissão da doença <sup>(108)</sup>.

A não adesão ao tratamento é o maior obstáculo para um eficiente controle da TB em países em desenvolvimento <sup>(109)</sup> sendo a principal causa do surgimento de cepas do *M. tuberculosis* resistentes às drogas, que tem comprometido seriamente o sucesso de programas destinados ao controle da doença. Esse tipo de TB é mais difícil de ser tratada, sendo necessária a mudança de medicação para drogas que são, geralmente, mais associadas a efeitos colaterais <sup>(110)</sup>.

O risco do desenvolvimento de TB ativa é muito alto nos dois primeiros anos de infecção. Portanto, alguns estudos mostram que a terapia preventiva desses indivíduos com infecção recente, como os contatos de pacientes ativos, poderia ser particularmente importante como uma medida de controle epidemiológico <sup>(111)</sup>.

## 1.9 PROFILAXIA

A indução prévia de resposta imune protetora reduz a incidência da doença primária nos casos susceptíveis, nos quais a resposta imune Th1 é deficiente. Baseado neste princípio, Calmette & Guérin desenvolveram uma vacina que reproduz, o mais próximo possível, uma infecção inicial, produzindo imunidade contra a TB, mas sem risco de doença. Essa vacina, denominada BCG, foi obtida de cepas do *M. bovis*, após muitos cultivos para se obter cepas menos virulentas<sup>(22,112)</sup>. Portanto, a BCG é uma cepa atenuada do *M. bovis*, porém, a base funcional desse processo de atenuação ainda não foi elucidada<sup>(101)</sup>.

A BCG tem sido administrada a milhões de crianças a cada ano, desde 1921. No entanto, de acordo com estudos, a vacinação promove a proteção principalmente durante a infância e contra as formas extrapulmonares e disseminadas da TB. A proteção contra a doença pulmonar na vida adulta é incerta e variável<sup>(113,114)</sup>. Além disso, devido a redução de sua eficácia com o passar do tempo, a vacina apresenta efeito limitado sugerindo que a vacinação na infância não previna a reativação em adultos.

Como a imunoprofilaxia consiste em uma forma bastante eficiente de manipulação da resposta imunológica no sentido de induzir resposta protetora e duradoura contra muitas doenças infecto-contagiosas, muitas pesquisas estão em andamento à procura de vacinas mais eficazes contra a TB<sup>(115,116)</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

Grande parte da população brasileira, além de estar em constante contato com micobactérias do ambiente, foi vacinada com a BCG e muitos indivíduos ainda receberam uma dose de reforço. Estes indivíduos, portanto, desenvolveram em maior ou menor grau, uma resposta imune celular adaptativa a seus antígenos.

Este fato faz com que os testes de detecção da resposta imune disponíveis atualmente tenham dificuldade no estabelecimento de características da imunidade conferida pela vacina e pela exposição a micobactérias ambientais daquela devido à infecção pelo *M. tuberculosis*.

Por isso há a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e utilização de novos antígenos para o melhor diagnóstico da TB.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi verificar se o padrão de resposta imune contra o antígeno recombinante **CFP-10** do *M. tuberculosis* é capaz de identificar a doença ativa.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da resposta imune celular de pacientes com TB ativa, pacientes tratados e indivíduos saudáveis PPD-positivo. Para isso, foi necessário:

- Análise e comparação da resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico frente ao BCG, ao PHA e ao antígeno recombinante CFP-10 em pacientes com TB ativa, em pacientes tratados e em indivíduos saudáveis.
- Comparação dos níveis de citocinas dos padrões Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4 e IL-13) e da citocina reguladora IL-10 *in vitro* e *in vivo* entre os pacientes com TB ativa, os pacientes tratados e os indivíduos saudáveis.
- Comparação dos padrões de resposta entre os grupos de pacientes.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES E CONTROLE

Participaram deste estudo 53 indivíduos com idades entre 20 e 75 anos, independentemente de etnia e sexo, residentes na cidade de Uberaba. Os participantes foram divididos em três grupos: pacientes com TB ativa (n=18), pacientes tratados de TB (n=16) e indivíduos saudáveis PPD-positivo (n=19).

Os pacientes ativos e tratados foram recrutados do Posto de Saúde Eurico Vilela, localizado na cidade de Uberaba, Minas Gerais, Brasil. O diagnóstico de TB foi confirmado pela equipe médica local através da baciloscopia positiva, cultura de escarro positiva e/ou raio-x juntamente com história clínica compatível. Todos pacientes com TB ativa se encontravam com, no máximo, 3 semanas de tratamento anti-TB.

O grupo controle dos indivíduos saudáveis PPD-positivo ( $\geq 10$  mm) foi formado por alunos dos 3º e 4º períodos dos cursos de Medicina, Enfermagem, Biomedicina, Nutrição, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Todos foram vacinados com a BCG.

Todos participantes da pesquisa eram negativos para HIV e assinaram o termo de consentimento para a participação na pesquisa e a realização da coleta de sangue.

Este estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM.

### 4.2 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas a partir da separação por gradiente de densidade utilizando-se o Ficoll-Paque (AMERSHAM, Uppsala, Suécia). Para isto, 30 ml de sangue foram colhidos por venopunção periférica em tubos vacutainer heparinizados (BD – Curitiba, PR, BRASIL) e transferidos lentamente para tubos plásticos cônicos de 50 ml (FALCON – Lincoln Park, NJ, USA), contendo 15 ml de solução de Ficoll-Paque. Os tubos foram centrifugados a 400g por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, um pouco do plasma foi coletado e armazenado

em *freezer* para posterior quantificação das citocinas. O anel de células formado na interface ficoll-plasma foi coletado com pipeta de 10 ml e transferido para outro tubo plástico cônico de 50 ml. O excesso de ficoll foi removido, lavando-se as células por três vezes com 15 ml de meio RPMI incompleto (GIBCO – Grand Island, NY, USA) por centrifugação, 200g a 10° C por 10 minutos <sup>(117)</sup>.

A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e ajustada de modo que se obtivesse  $2,0 \times 10^6$  células/ml utilizadas na produção de sobrenadantes. As células foram, então, suspensas novamente em meio RPMI completo [RPMI suplementado com 2 mmoles de L-glutamina (GIBCO), soro fetal bovino a 5%, 50µg/ml de gentamicina (ARISTON – Brasil), 2 mmoles de HEPES (GIBCO) e 50µmoles de 2-mercaptoetanol (GIBCO)].

A viabilidade das células foi determinada, utilizando-se o teste de exclusão do azul de tripan. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis, utilizando-se capela de fluxo laminar.

Os tipos de placas de cultivo utilizadas foram de 24 cavidades (FALCON) para a produção de sobrenadantes e quantificação de citocinas e de 96 cavidades (NUNC) para a realização dos testes de proliferação celular. Cada poço das placas de cultura de 24 poços recebeu 1 ml de suspensão de células (aproximadamente 2.000.000 de células), que foram incubadas por 48 horas e 120 horas em presença de: meio, fitohemaglutinina (PHA), *M. bovis* BCG e o antígeno específico do *M.tuberculosis*, o CFP-10. Cada poço das placas de 96 cavidades recebeu 200 µl de suspensão e foram incubados por 96 horas em presença de meio e dos mesmos estímulos.

#### 4.3 RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS

Os ensaios de proliferação celular foram realizados sempre em triplicatas e às células de cada poço foram acrescentados:

- Meio RPMI Completo (SIGMA – St Louis, MO, USA).
- Fitohemaglutinina (PHA) a 2µg/ml (SIGMA).
- *M. bovis* BCG a 2µg/ml (Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil)

▪ Antígeno recombinante do *Mycobacterium tuberculosis* (rCFP-10) a 1µg/ml (Cedido pelo prof. Antônio C. Neto, Boston).

As culturas foram incubadas por 96 horas em estufa com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso, foram adicionados 0,5 µCi de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham Bioscience, USA) em cada cavidade das placas e foram incubadas novamente por mais 8 horas. Ao final do período de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro com auxílio de um aparelho coletor de células (Cell-Harvester - SKATRON, Lier, Noruega). Após secos em temperatura ambiente, os fragmentos do papel foram colocados em tubos apropriados, cobertos com 4ml de líquido de cintilação e submetidos à determinação da radioatividade incorporada ao DNA das células, utilizando-se um contador de cintilação β (Beckman - LS6000IC, Fullerton, Califórnia, USA).

Os resultados foram expressos em índice de proliferação (IP), produto da divisão do valor médio, em cintilação por minuto (cpm), das triplicatas das proliferações cultivadas com o estímulo (antígeno ou mitógeno) pelo valor, em cpm, das médias das triplicatas cultivadas somente com meio de cultura. Foi considerada presença de proliferação celular quando os índices de proliferação (IP) foram iguais ou maiores a dois ( $\geq 2$ ).

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas foram quantificadas nos plasmas e nos sobrenadantes de cultura de PBMC.

O procedimento para a produção de sobrenadantes foi realizado sempre em duplicata para que fosse possível a coleta do material com 48h e 120h de cultivo.

Neste ensaio, foram distribuídos nas placas 1 ml/poço da suspensão de células, que foram co-cultivadas com meio, *M. bovis* BCG, PHA e o antígeno CFP-10, da seguinte forma:

- Meio;
- PHA (5µg/ml) (SIGMA);
- *M. bovis* BCG (5µg/ml) (Instituto Butantan);
- rCFP-10 (2,5µg/ml) (Cedido pelo prof. Antônio C. Neto, Boston).

Após 48h e 120h de incubação em estufa com atmosfera enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados e estocados em *freezer*, a uma temperatura de -70°C, para que pudessem ser posteriormente utilizados na quantificação das citocinas.

As citocinas foram dosadas pela técnica de ELISA, utilizando-se pares de anticorpos específicos para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13 e IL-10.

Para a dosagem dessas citocinas, placas de 96 poços de alta afinidade (NUNC - Roskilde, Dinamarca), foram incubadas por 18h, com 100 $\mu$ l dos seguintes anticorpos monoclonais específicos, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,4:

- mAb anti-TNF- $\alpha$  a 1 $\mu$ g/ml (BD PHARMINGEM - San Diego, Califórnia, USA);
- mAb anti -IL-10 a 1 $\mu$ g/ml (BD PHARMINGEM);
- mAb anti -IFN- $\gamma$  a 1 $\mu$ g/ml (BD PHARMINGEM);
- mAb anti -IL-13 a 1 $\mu$ g/ml (BD PHARMINGEM);
- mAb anti - IL-4 a 1 $\mu$ g/ml (BD PHARMINGEM).

Após a incubação, as placas foram aspiradas e lavadas com 200 ml de solução TWEEN 20 a 0,05% em PBS (PBS-TWEEN) por três vezes. A seguir, as placas foram bloqueadas com 200 $\mu$ l de PBS contendo 2% de albumina bovina (PBS-BSA a 2%), deixadas em temperatura ambiente por 1h e, posteriormente, aspiradas e lavadas. Efetuado o bloqueio, 50 $\mu$ l dos sobrenadantes e plasmas, diluídos 1:2 em PBS-BSA, foram adicionados às placas. Paralelamente, foi realizada uma curva padrão com cada uma das citocinas recombinantes, em concentrações de 1000 pg/ml a 16,25 pg/ml. As placas foram, então, incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente.

Após a incubação, as placas foram aspiradas e lavadas. Em cada cavidade foram acrescentados 100 $\mu$ l da solução do segundo anticorpo conjugado com biotina (Ac-B anti-IL-4, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  à 1 $\mu$ g/ml). Ao término de 2h, a uma temperatura de 37°C, as placas foram novamente aspiradas e lavadas. Após esta etapa, foram adicionados 80  $\mu$ l/poço de estreptoavidina conjugada com peroxidase (BD Biosciences) diluída 1:1000. Nesta última fase, as placas foram incubadas por mais 2 horas a 37°C, lavadas novamente, quando então foram acrescentados 100  $\mu$ l/poço do tampão de revelação (Tampão Substrato-G a 1mg/ml com OPD) (PHARMINGEM). As placas foram colocadas para reagir ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. As leituras das placas foram realizadas por um leitor automático de ELISA (BIORAD 2550 READER EIA) e os resultados obtidos a partir da medida das absorvâncias, a um comprimento de onda de 405 (Abs<sub>405</sub>). As concentrações das citocinas

---

foram determinadas em pg/ml, através do cálculo dos valores das absorvâncias obtidas, levando-se em consideração uma curva padrão de citocina recombinante que foi realizada simultaneamente. O limite de detecção do ensaio é de 0,5 pg/ml para a IL-4 e de 10 pg/ml para as demais.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística, as variáveis de *distribuição normal e variância homogênea* foram analisadas utilizando-se testes paramétricos e do contrário, foram aplicados testes não paramétricos. Para a comparação entre os grupos, utilizou-se o Teste "t" de Student, o Kruskal-Wallis ou o Mann-Whitney. Para comparar proporções utilizou-se o qui-quadrado para proporções. O teste de Bartlett foi usado para avaliar a homogeneidade das amostras. Nos casos onde os valores das medianas foram iguais a zero, optou-se pela comparação das médias, empregando-se análise de variância. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Para armazenamento e análise dos dados foi empregado o software Statview 4.0.

## 5 RESULTADOS

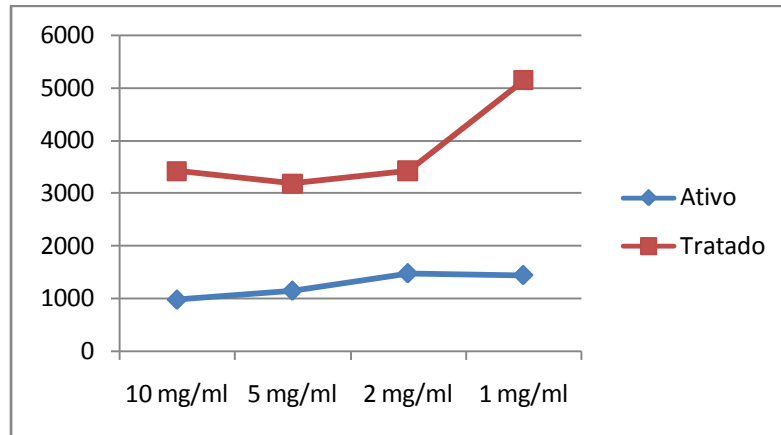
Participaram deste estudo 18 pacientes com TB e 16 pacientes tratados selecionados a partir do Posto de Saúde Eurico Vilela (Uberaba, MG) e 19 indivíduos saudáveis PPD-positivo que realizavam curso de graduação na área da saúde na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). A distribuição dos participantes do estudo de acordo com a idade e o gênero está demonstrada na tabela 2.

**Tabela 2.** Distribuição dos participantes do estudo de acordo com a idade e gênero.

Clínica	N (%)	Idade (Média ± DP)	Gênero	
			Fem.	Masc.
Ativos	18 (34%)	41,3 ± 13	8 (44,4%)	10 (55,6%)
Tratados	16 (30,2 %)	46,7 ± 14	8 (50%)	8 (50%)
Saudáveis	19 (35,8 %)	21,6 ± 1,5	12 (63,2%)	7 (36,8%)

### 5.1 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

A resposta imune celular foi avaliada pela capacidade proliferativa das células mononucleares do sangue periférico entre os grupos de participantes do estudo (ativos, tratados e saudáveis) frente aos diferentes estímulos (PHA, BCG e CFP-10) (FIG. 3). Inicialmente, foi realizado estudo para se determinar a concentração do antígeno CFP-10 que permitia a melhor resposta proliferativa (FIG. 2). Para análise, então, dos grupos de estudo, fez-se a opção pela concentração de 1 µg/ml.



**FIGURA 2.** Comparação da resposta proliferativa de linfócitos frente a diferentes concentrações do antígeno CFP-10 entre paciente ativo e tratado. Os resultados são expressos em cpm.  
 #Proliferação sem estímulo: 2628,2 cpm (ativo) e 2818,9 cpm (tratado).

Os resultados da resposta proliferativa foram expressos em índice de proliferação, obtido pela razão entre a cultura estimulada e a cultura não estimulada. Foi considerada presença de proliferação celular quando os índices de proliferação (IP) foram iguais ou maiores a dois ( $\geq 2$ ).

Os valores das medianas das respostas proliferativas dos indivíduos por grupo frente aos diferentes estímulos encontram-se relacionados na tabela 3.

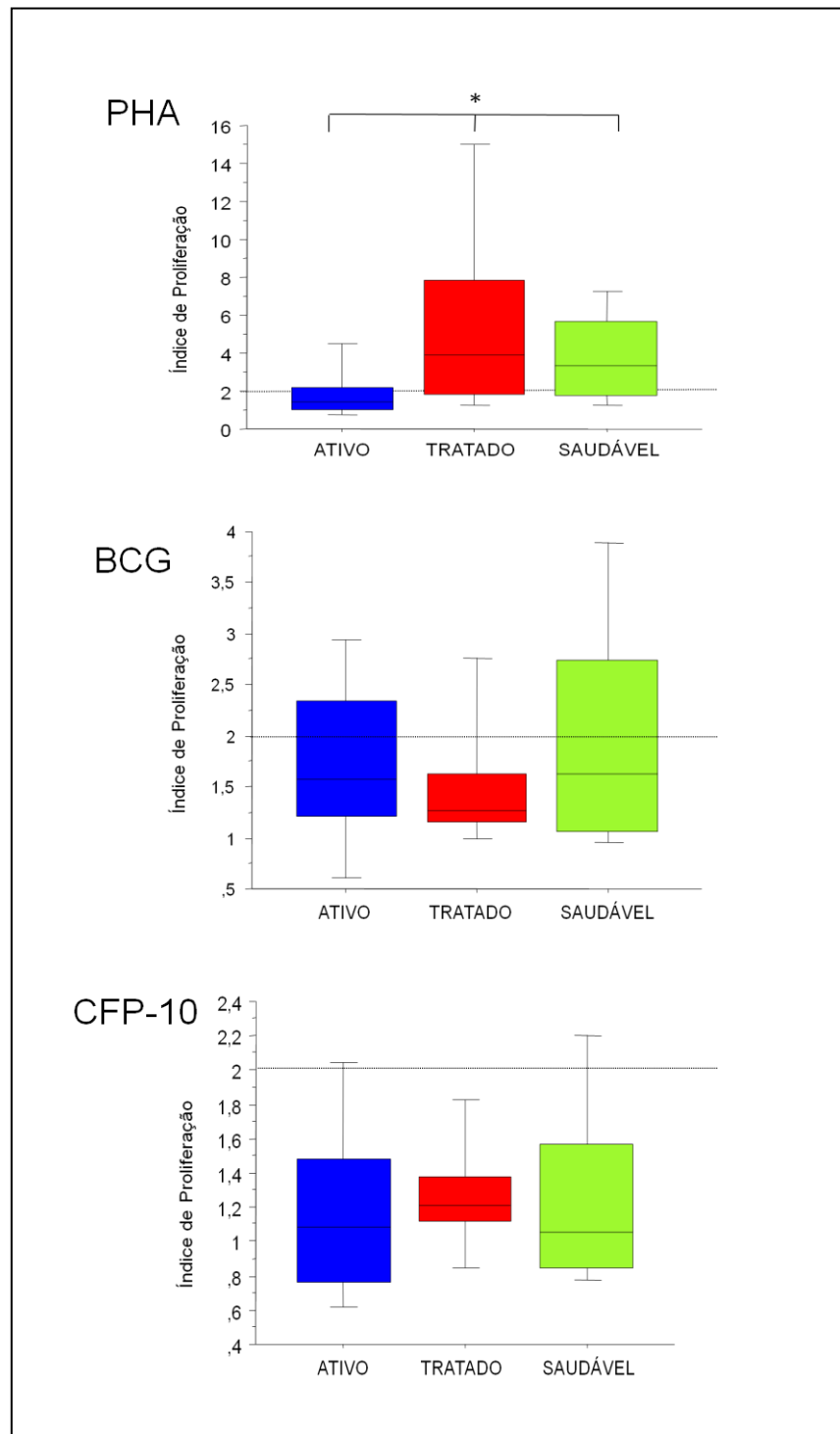
Foi possível observar um aumento significativo da resposta proliferativa das células dos indivíduos tratados e saudáveis após o cultivo com PHA quando comparados aos pacientes ativos (Kruskal-Wallis;  $p=0,008$ ) (FIG. 3).

A análise dos índices de proliferação frente ao BCG e ao antígeno CFP-10 não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de indivíduos (Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ) (FIG. 3).

**Tabela 3.** Medianas dos índices de proliferação (IP), com seus respectivos valores mínimo e máximo, de PBMC dos grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19) frente aos diferentes estímulos.

	PHA	BCG	CFP-10
<b>ATIVOS</b>			
Md	1,4	1,5	1,0
(Vmín; Vmáx)	(0,4; 7,4)	(0,28; 5,0)	(0,3; 2,2)
<b>TRATADOS</b>			
Md	4,0	1,2	1,2
(Vmín; Vmáx)	(0,7; 18,1)	(0,9; 16,0)	(0,8; 2,4)
<b>SAUDÁVEIS</b>			
Md	3,2	1,6	1,0
(Vmín; Vmáx)	(1,0; 7,4)	(0,8; 5,5)	(0,7; 2,8)



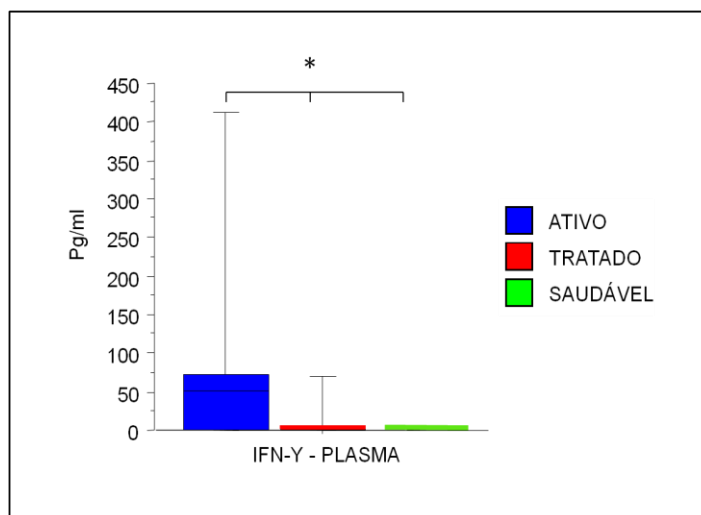


**FIGURA 3.** Resposta proliferativa, representada em índice de proliferação, de PBMC dos grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19), frente aos estímulos de PHA, BCG e CFP-10. A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \*p=0,008

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Foram analisadas as citocinas após 48h e 120h de cultivo das células mononucleares, com estímulos específicos (BCG e CFP-10) e com mitógeno (PHA). As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 foram quantificadas nos plasmas e nos sobrenadantes de cultura das células cultivadas por 48h. O IFN- $\gamma$  e a IL-13 foram dosados nos plasmas e nos sobrenadantes após 120h de cultivo.

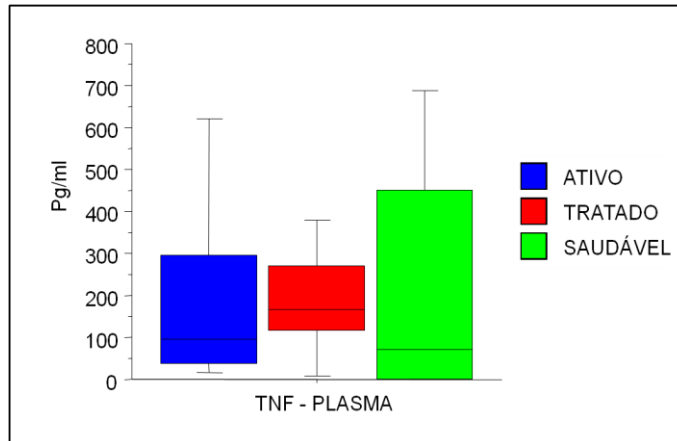
A análise dos níveis plasmáticos das citocinas quando os três grupos de pacientes (ativos, tratados e saudáveis) foram comparados (Kruskal-Wallis), evidenciou diferença para a citocina Th1 IFN- $\gamma$  que se mostrou mais elevada nos pacientes com doença ativa (pulmonar e extrapulmonar) (Md=53 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=2359 pg/ml), sendo a diferença significativa em relação aos pacientes tratados (Md=0 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=74 pg/ml) e aos indivíduos saudáveis (Md=0 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=5 pg/ml) (Kruskal-Wallis;  $p=0,0004$ ) (FIG. 4).



**FIGURA 4.** Comparação dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \* $p=0,0004$

Em relação aos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , nos pacientes ativos variaram de 0 pg/ml a 993 pg/ml, com mediana de 97 pg/ml, nos tratados, variaram de 0 pg/ml a 410 pg/ml, com mediana de 165 pg/ml e nos indivíduos saudáveis os níveis variaram de 0 pg/ml a 852 pg/ml, com mediana de 70 pg/ml. Não foram observadas diferenças estatisticamente

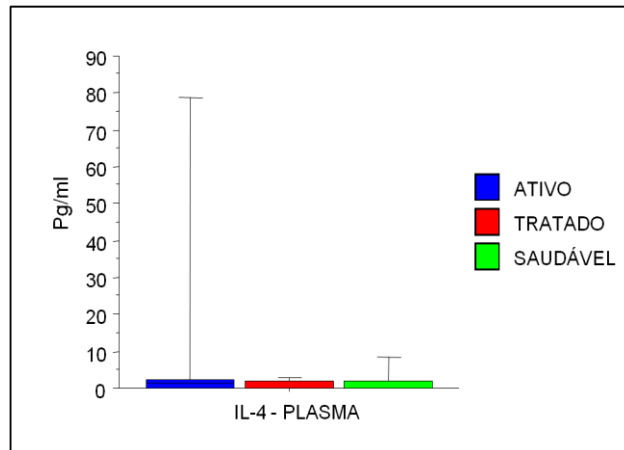
significativas nos níveis plasmáticos dessa citocina entre os três grupos (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ) (FIG. 5).



**FIGURA 5.** Comparação dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90.

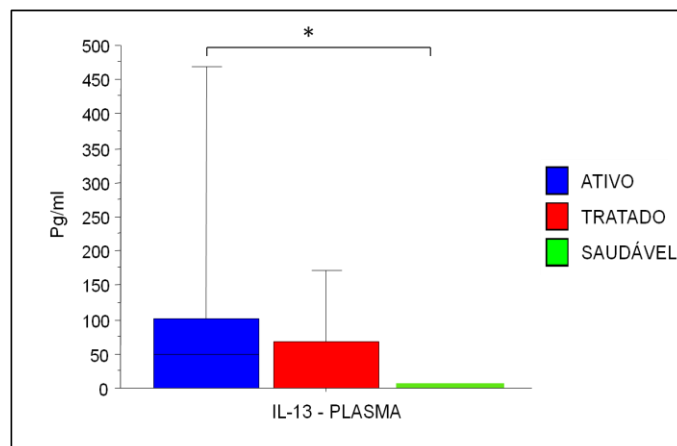
Com o objetivo de se verificar o perfil Th2 dos participantes do estudo, foram quantificados os níveis plasmáticos de IL-4.

Nos pacientes ativos os níveis dessa citocina variaram de 0 pg/ml a 275 pg/ml, com mediana de 1,5 pg/ml, nos tratados, variaram de 0 pg/ml a 29 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml e nos indivíduos saudáveis, foram de 0 pg/ml a 40 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml. Da mesma forma, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de IL-4 entre os três grupos (Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ). No entanto, apesar de não ser significativo, os pacientes ativos apresentaram uma tendência a possuírem níveis plasmáticos de IL-4 mais elevados que os indivíduos saudáveis (Mann-Whitney;  $p = 0,08$ ) (FIG. 6).



**FIGURA 6.** Comparação dos níveis plasmáticos de IL-4 entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90.

Além da citocina IL-4, outra importante citocina Th2 quantificada foi a IL-13. Os níveis plasmáticos de IL-13 foram maiores entre os pacientes com TB ativa (Md=48 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1918 pg/ml), sendo a diferença significativa apenas em relação aos indivíduos saudáveis (Md=0 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=4,5 pg/ml) (Kruskal-Wallis;  $p=0,004$ ). Nos pacientes tratados os níveis variaram de 0 pg/ml a 658 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml (FIG. 7).

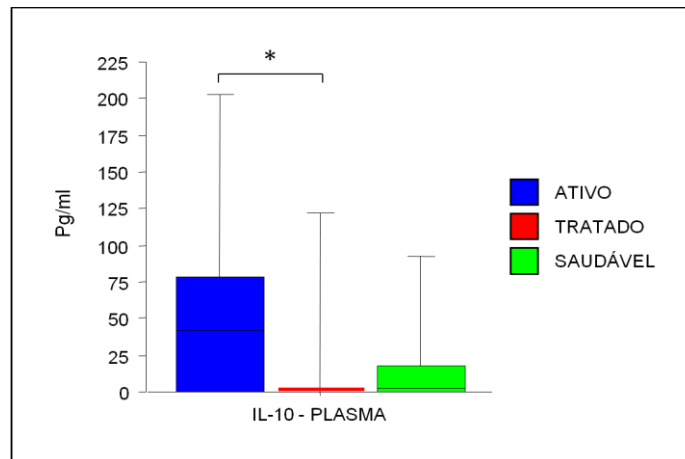


**FIGURA 7.** Comparação dos níveis plasmáticos de IL-13 entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \*  $p=0,004$

Além das citocinas dos perfis Th1 e Th2, também foi quantificada uma citocina com função anti-inflamatória, a IL-10.

Foi possível verificar também níveis plasmáticos de IL-10 maiores entre os pacientes com doença ativa (Md=43 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=602 pg/ml), sendo a

diferença significativa apenas em relação aos pacientes tratados (Md=0 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=157 pg/ml) (Kruskal-Wallis; p=0,02). Os pacientes ativos apresentaram uma tendência a produzirem mais IL-10 que os indivíduos saudáveis (Md=2 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=136 pg/ml) (Mann-Whitney; p=0,1) (FIG. 8).



**FIGURA 8.** Comparação dos níveis plasmáticos de IL-10 entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \* p=0,02

Foi analisada também a produção das citocinas nos sobrenadantes de cultura das células mononucleares do sangue periférico dos participantes do estudo.

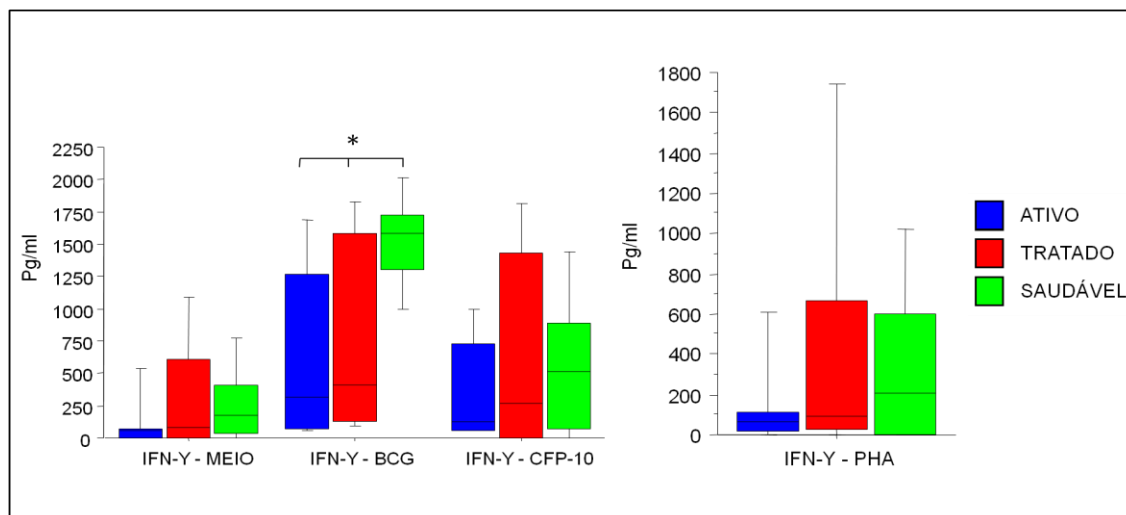
Em relação à produção de IFN- $\gamma$ , não houve diferença significativa nos sobrenadantes de cultura sem estímulo entre os três grupos de participantes do estudo (Kruskal-Wallis; p>0,05). No entanto, houve uma tendência de os indivíduos saudáveis (Md=175 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1377 pg/ml) produzirem mais IFN- $\gamma$  que os ativos (Md=53 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=791 pg/ml) (Mann-Whitney; p=0,08) nessas condições de cultura. A produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura sem estímulo entre os tratados variou de 0 pg/ml a 1925 pg/ml, com mediana de 81 pg/ml (FIG. 9).

Foi possível observar diferença estatisticamente significativa na produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes após estímulo com BCG, que se mostrou elevada no grupo dos indivíduos saudáveis (Md=1570 pg/ml; Vmín=57 pg/ml, Vmáx=2153 pg/ml) quando comparado aos grupos dos pacientes ativos (Md=284 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1711 pg/ml) e tratados (Md=407 pg/ml; Vmín=73 pg/ml, Vmáx=2165 pg/ml) (Kruskal-Wallis; p=0,003) (FIG. 9).

Em relação à produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura após estímulo com CFP-10, não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os três grupos

(Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ). Pode-se dizer que, frente ao CFP-10, os saudáveis (Md=531 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1596 pg/ml) apresentaram uma tendência a produzirem mais IFN- $\gamma$  que os pacientes com TB ativa (Md=104 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1925 pg/ml) (Mann-Whitney;  $p=0,26$ ). A produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura frente ao CFP-10 entre os pacientes tratados variou de 0 pg/ml a 2181 pg/ml, com mediana de 270 pg/ml (FIG. 9).

Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura de células estimuladas com PHA ao comparar os grupos de pacientes ativos (Md=65 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=787 pg/ml), tratados (Md=94 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=2209 pg/ml) e indivíduos saudáveis (Md=208 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1692 pg/ml) (Kruskal-Wallis;  $p>0,05$ ) (FIG. 9).



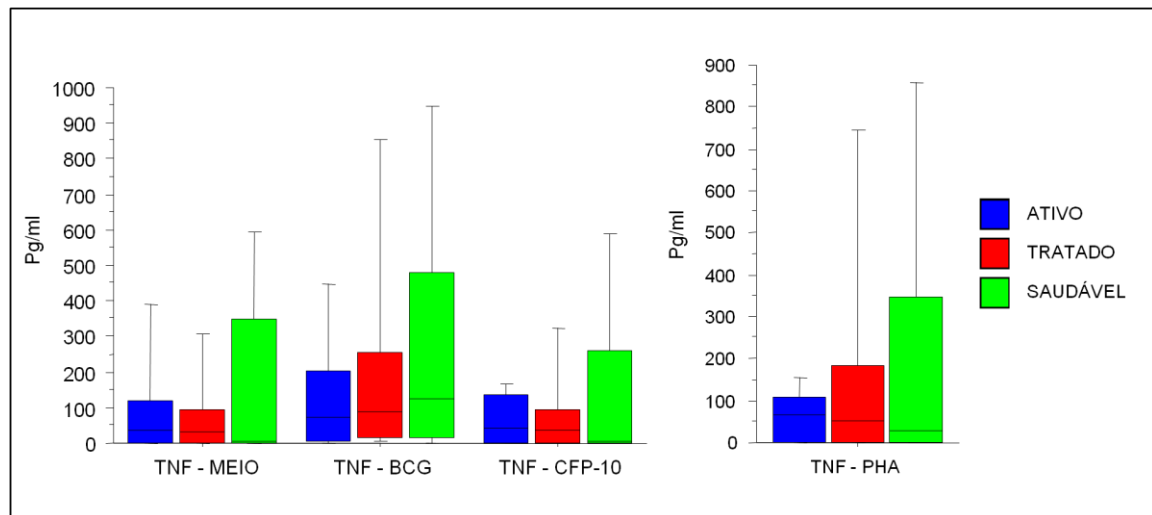
**FIGURA 9.** Produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \*  $p=0,003$

Em relação à produção de TNF- $\alpha$ , a produção nos sobrenadantes de cultura sem estímulo entre os pacientes ativos variou de 0 pg/ml a 742 pg/ml, com mediana de 34 pg/ml, entre os tratados variou de 0 pg/ml a 556 pg/ml, com mediana de 32 pg/ml e entre os indivíduos saudáveis variou de 0 pg/ml a 843 pg/ml, com mediana de 4 pg/ml.

Nos sobrenadantes de cultura frente ao BCG a produção de TNF- $\alpha$  entre os indivíduos saudáveis variou de 0 pg/ml a 1003 pg/ml, com mediana de 124 pg/ml, entre os ativos variou de 0 pg/ml a 1139 pg/ml, com mediana de 73 pg/ml e entre os tratados, variou de 0 pg/ml a 1041 pg/ml, com mediana de 89 pg/ml (FIG. 10).

Após o estímulo com CFP-10 a produção de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes dos pacientes ativos variou de 0 pg/ml a 567 pg/ml, com mediana de 40 pg/ml, nos sobrenadantes dos pacientes tratados variou de 0 pg/ml a 555 pg/ml, com mediana de 34 pg/ml e entre os indivíduos saudáveis a produção variou de 0 pg/ml a 728 pg/ml, com mediana de 6 pg/ml. E nos sobrenadantes de cultura após o estímulo de PHA, a produção de TNF- $\alpha$  entre os pacientes ativos variou de 0 pg/ml a 473 pg/ml, com mediana de 63 pg/ml, entre os tratados variou de 0 pg/ml a 768 pg/ml, com mediana de 51 pg/ml e entre os saudáveis, variou de 0 pg/ml a 897 pg/ml, com mediana de 27 pg/ml.

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa na produção de TNF- $\alpha$  frente aos estímulos quando os três grupos de participantes foram comparados (FIG. 10).



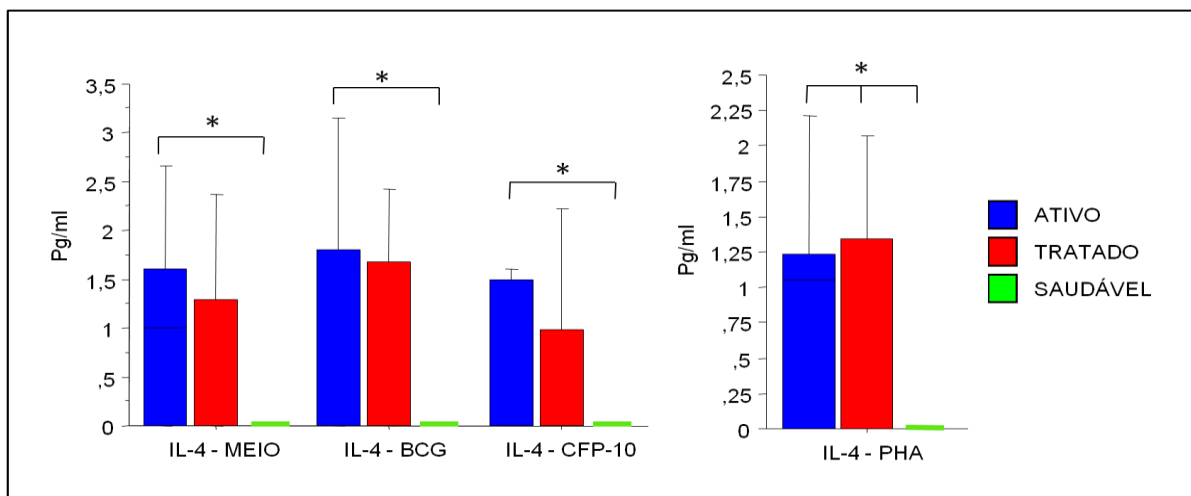
**FIGURA 10.** Produção de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90.

Em relação às citocinas Th2, verificou-se que a produção de IL-4 foi maior entre os pacientes com TB ativa nos sobrenadantes de culturas sem estímulo (Md=1 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=6,5 pg/ml) ( $p=0,008$ ) e após os estímulos com BCG (Md=0 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=4,4 pg/ml) ( $p=0,02$ ) e CFP-10 (Md=0 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=2,1 pg/ml) ( $p=0,04$ ), sendo essa diferença significativa apenas em relação aos indivíduos saudáveis (Kruskal-Wallis) (FIG. 11).

Em relação à produção de IL-4 após o estímulo de PHA, foi observada uma produção significativamente maior entre os pacientes ativos (Md=1 pg/ml; Vmín=0 pg/ml,

V<sub>máx</sub>=3,1 pg/ml) e os tratados (Md=0 pg/ml; V<sub>mín</sub>=0 pg/ml, V<sub>máx</sub>=2,5 pg/ml) quando comparados aos indivíduos saudáveis (Kruskal-Wallis; p=0,01) (FIG. 11).

A produção de IL-4 entre os pacientes tratados variou de 0 pg/ml a 7,8 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml nos sobrenadantes de cultura sem estímulo, de 0 pg/ml a 2,6 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml nos sobrenadantes de cultura estimulada com BCG e de 0 pg/ml a 4,7 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml nas culturas estimuladas com CFP-10. Já entre os indivíduos saudáveis não se detectou produção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura (FIG. 11).



**FIGURA 11.** Produção de IL-4 em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \*  $p \leq 0,05$

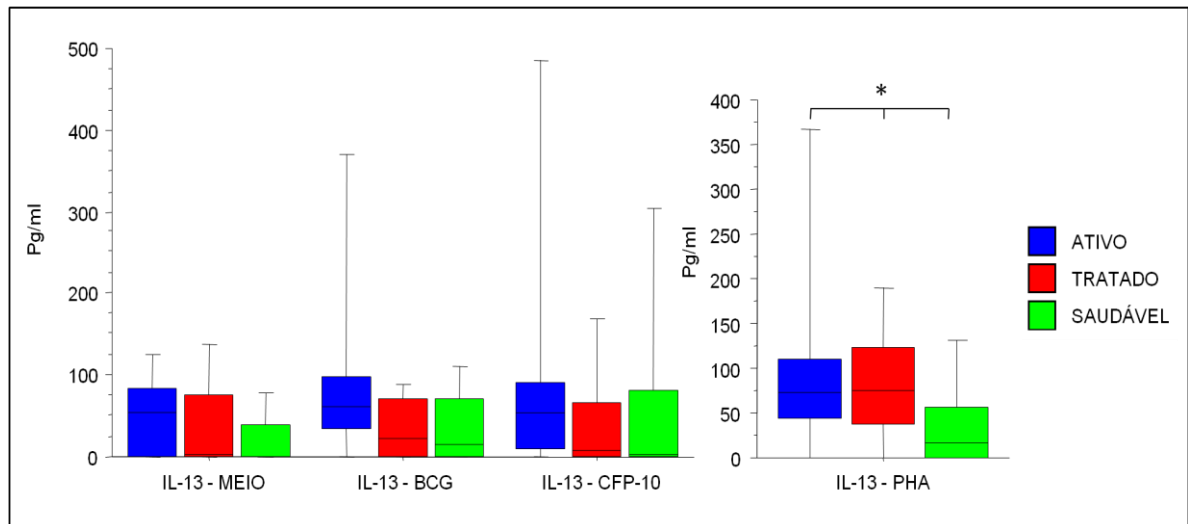
Ao comparar a produção de IL-13 nos sobrenadantes de cultura entre os três grupos, foi possível verificar uma produção significativamente maior nos grupos dos pacientes ativos (Md=73 pg/ml; V<sub>mín</sub>=0 pg/ml, V<sub>máx</sub>=2497,6 pg/ml) e tratados (Md=75 pg/ml; V<sub>mín</sub>=0 pg/ml, V<sub>máx</sub>=250 pg/ml) após estímulo com PHA quando comparados aos indivíduos saudáveis (Md=17 pg/ml; V<sub>mín</sub>=0 pg/ml, V<sub>máx</sub>=202 pg/ml) (Kruskal-Wallis; p=0,03) (FIG. 12).

Não houve diferença significativa na produção de IL-13 entre os três grupos nos sobrenadantes de cultura sem estímulo e após os estímulos de BCG e CFP-10 (Kruskal-Wallis; p>0,05). No entanto, os pacientes com TB ativa apresentaram tendência a produzirem maiores quantidades dessa citocina quando comparados aos indivíduos saudáveis nessas condições de cultura [Mann-Whitney; p=0,059 (meio); p=0,07 (BCG); p=0,1 (CFP-10)] (FIG. 12).



Nos sobrenadantes de cultura sem estímulo, a produção de IL-13 entre os pacientes ativos variou de 0 pg/ml a 194 pg/ml, com mediana de 53 pg/ml, entre os tratados variou de 0 pg/ml a 1058 pg/ml, com mediana de 2,5 pg/ml e entre os saudáveis a produção variou de 0 pg/ml a 350 pg/ml, com mediana de 0 pg/ml.

Os níveis de IL-13 nos sobrenadantes de cultura com estímulo de BCG entre os pacientes ativos variaram de 0 pg/ml a 704 pg/ml, com mediana de 60 pg/ml, entre os tratados os níveis variaram de 0 pg/ml a 108 pg/ml, com mediana de 21 pg/ml e entre os saudáveis, variaram de 0 pg/ml a 221 pg/ml, com mediana de 14 pg/ml. Os níveis de IL-13 após estímulo com CFP-10 entre os pacientes ativos variaram de 0 pg/ml a 1308 pg/ml, com mediana de 54 pg/ml, entre os tratados, variaram de 0 pg/ml a 274 pg/ml, com mediana de 7 pg/ml e entre os saudáveis os níveis variaram de 0 pg/ml a 427 pg/ml, com mediana de 3,5 pg/ml (FIG. 12).



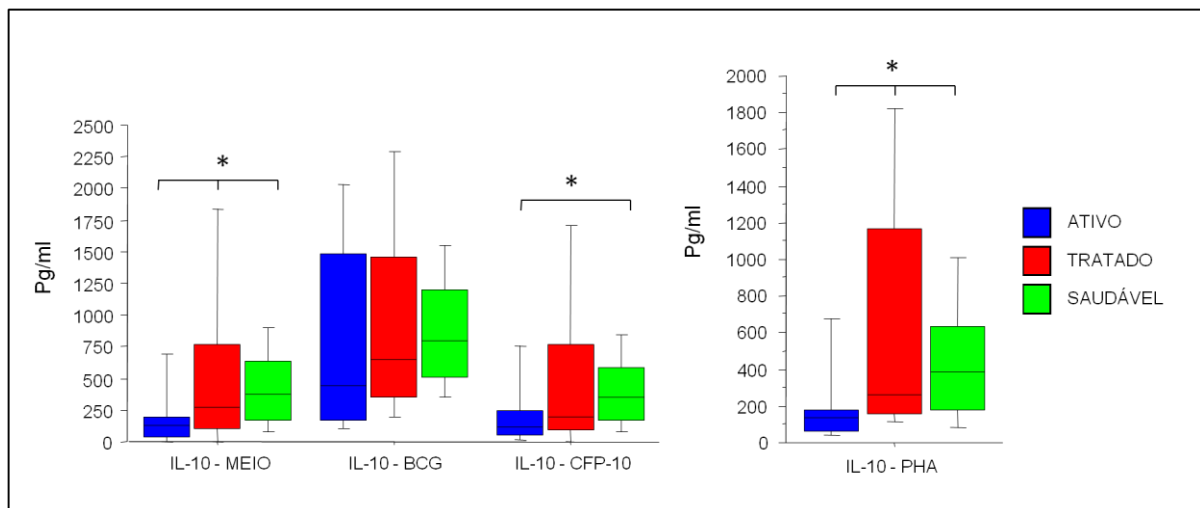
**FIGURA 12.** Produção de IL-13 em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos (n=18), tratados (n=16) e saudáveis (n=19). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \* p=0,03

A produção da citocina reguladora IL-10 nos sobrenadantes de cultura mostrou um comportamento contrário ao observado no plasma, pois se apresentou mais elevada no grupo dos indivíduos saudáveis (FIG. 13).

Em relação à produção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura sem estímulo, observou-se que os grupos dos indivíduos saudáveis (Md=375 pg/ml; Vmín=29 pg/ml, Vmáx=1208 pg/ml) e dos pacientes tratados (Md=273 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=2243 pg/ml) apresentaram uma produção significativamente maior que os pacientes com TB ativa (Md=130 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1554 pg/ml) (Kruskal-Wallis; p=0,02). O mesmo

aconteceu nas culturas estimuladas com PHA, os grupos dos indivíduos saudáveis (Md=384 pg/ml; Vmín=26 pg/ml, Vmáx=1085 pg/ml) e dos pacientes tratados (Md=261 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1983 pg/ml) produziram significativamente mais IL-10 quando comparados ao grupo dos pacientes com TB ativa (Md=132 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1478 pg/ml) (Kruskal-Wallis;  $p=0,005$ ) (FIG. 13).

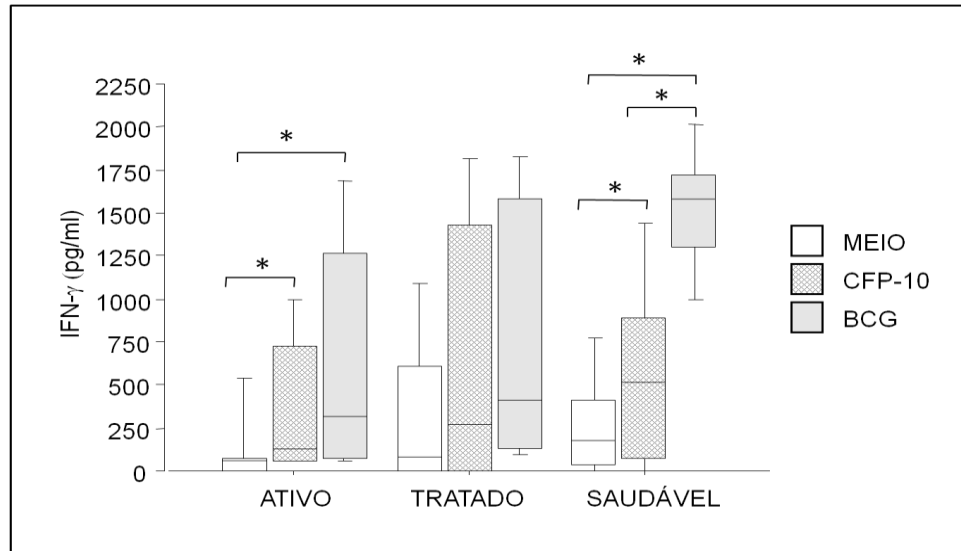
Após o estímulo do CFP-10, houve uma maior produção de IL-10 entre os indivíduos saudáveis (Md=356 pg/ml; Vmín=63 pg/ml, Vmáx=1081 pg/ml), sendo a diferença significativa apenas em relação aos pacientes ativos (Md=112 pg/ml; Vmín=0 pg/ml, Vmáx=1497 pg/ml) (Kruskal-Wallis;  $p=0,03$ ). Já frente ao BCG, as células dos indivíduos saudáveis (Md=799 pg/ml; Vmín=250 pg/ml, Vmáx=1723 pg/ml) produziram mais IL-10 que a dos pacientes ativos (Md=442 pg/ml; Vmín=67 pg/ml, Vmáx=2431 pg/ml), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa, apresentando apenas uma tendência (Mann-Whitney;  $p=0,1$ ). A produção de IL-10 entre os pacientes tratados nos sobrenadantes de cultura após o estímulo de CFP-10 variou de 0 pg/ml a 1813 pg/ml, com mediana de 195 pg/ml e após o estímulo de BCG, variou de 109 pg/ml a 2517 pg/ml, com mediana de 647 pg/ml (FIG. 13).



**FIGURA 13.** Produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de PBMC sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10 e PHA entre os grupos de participantes ativos ( $n=18$ ), tratados ( $n=16$ ) e saudáveis ( $n=19$ ). A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \*  $p \leq 0,05$

Ao analisar a produção das citocinas frente aos diferentes estímulos dentro do mesmo grupo, foi possível observar que nos pacientes ativos e saudáveis tanto o BCG quanto o CFP-10 foram capazes de induzir aumento significativo da produção de IFN- $\gamma$  quando comparados à produção espontânea (meio). Nos indivíduos saudáveis houve ainda uma

produção maior de IFN- $\gamma$  frente ao BCG quando comparado ao CFP-10. Já nos pacientes tratados não houve diferença na produção dessa citocina frente aos estímulos (FIG. 14). Para as demais citocinas, não houve diferença significativa após estímulo com CFP-10 (dados não mostrados).



**FIGURA 14.** Produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de PBMC nos grupos de pacientes com TB ativa (n=18) e indivíduos tratados (n=16) e saudáveis (n=19), sem estímulo e após estímulos de BCG, CFP-10. A linha horizontal interna da barra representa a mediana; a barra representa os percentis 25 e 75; os extremos inferior e superior da haste representam os percentis de 10 e 90. \*  $p \leq 0,05$

## 6 DISCUSSÃO

O estudo da resposta imune a antígenos específicos do *M. tuberculosis* é importante para o entendimento dos mecanismos patológicos e protetores do sistema imune contra a TB e também para a identificação de antígenos com potencial diagnóstico e para o desenvolvimento de novas vacinas.

Métodos diagnósticos convencionais como baciloscopia do escarro, cultura e teste intradérmico com PPD apresentam, respectivamente, baixa sensibilidade, longo tempo de execução e baixa especificidade. Um teste diagnóstico utilizando um antígeno específico que consiga diferenciar os indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* daqueles vacinados com a BCG e aqueles expostos a micobactérias ambientais é de extrema importância.

Estudos mostram que o antígeno CFP-10 está associado à virulência do *M. tuberculosis*. Cepas mutantes de *M. tuberculosis* que não apresentavam o gene do CFP-10 e também do ESAT-6 possuíam uma menor capacidade de provocar lise celular e invasão tecidual, demonstrando um menor dano pulmonar<sup>(101,118,119)</sup>. Portanto, pode-se dizer que essas proteínas provavelmente exercem um papel essencial na patogênese da TB.

O objetivo deste estudo foi verificar se a resposta imune contra o antígeno recombinante CFP-10 do *M. tuberculosis* é capaz de diferenciar a imunidade desenvolvida pela vacina BCG daquela devido à infecção pela micobactéria. Para isso, foi analisada a resposta imune celular de 18 pacientes com TB ativa (41,3 anos  $\pm$  13), 16 pacientes tratados (46,7 anos  $\pm$  14) e 19 indivíduos saudáveis PPD-positivo (21,6 anos  $\pm$  1,5). Vinte e oito (52,8%) participantes eram do sexo feminino.

A resposta imune celular foi analisada através de cultura de PBMC para ensaios de proliferação celular e produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-13) e a citocina reguladora IL-10 frente aos estímulos de PHA, BCG e CFP-10.

A análise da capacidade proliferativa de PBMC dos grupos dos pacientes estudados (pacientes ativos, tratados e indivíduos saudáveis) mostrou que as células dos pacientes com TB ativa apresentaram baixos níveis de proliferação frente ao PHA, quando comparados aos pacientes tratados e aos controles saudáveis. Os pacientes ativos não apresentaram resposta aos estímulos antigênicos e nem mesmo ao mitógeno, já os tratados e os saudáveis não responderam aos antígenos, mas apresentaram resposta ao mitógeno. Isso demonstra a possibilidade da existência de uma imunorregulação nos pacientes ativos.

Estudos têm demonstrado que pacientes com TB ativa apresentam uma resposta proliferativa celular fraca e uma forte resposta humoral, enquanto que, contatos saudáveis

PPD-positivo apresentam fraca resposta humoral e uma forte resposta celular a antígenos do *M. tuberculosis* <sup>(120,121)</sup>.

Sánchez e colaboradores (1994) observaram que os pacientes com TB ativa apresentaram uma resposta proliferativa significativamente menor que os controles saudáveis, frente a outro estímulo, o PPD. Já a resposta proliferativa frente ao PHA foi similar entre os dois grupos <sup>(122)</sup>.

Por outro lado, Al-Attiyah e Mustafa (2008) observaram que as células de pacientes com TB ativa apresentaram alta proliferação em resposta a um pool de antígenos da região gênica RD1 <sup>(123)</sup>, região onde se encontra o gene que codifica o antígeno CFP-10. Essa resposta pode ter sido devido à utilização de vários antígenos juntos, consequentemente pode ter ocorrido uma resposta a diferentes epítomos.

No atual estudo, o ensaio de proliferação celular frente ao estímulo CFP-10 não foi capaz de discriminar os indivíduos saudáveis vacinados PPD-positivo dos pacientes ativos.

Frente a um estímulo antigênico, células T CD4+ se diferenciam em subtipos Th1 e Th2, que se caracterizam pela produção de um perfil distinto de citocinas. Células Th1 são induzidas por IL-12 e secretam IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ; essas citocinas ativam as funções microbidas de macrófagos e outras células e iniciam (e provavelmente mantêm) as respostas protetoras inflamatórias granulomatosas. As células Th2 são induzidas por IL-4 e são produtoras de IL-4, IL-13 e também IL-10 <sup>(124)</sup>.

Os indivíduos saudáveis, mesmo com a exposição ao *M. tuberculosis* (explicada pelo teste intradérmico (PPD) maior que 10 mm), não apresentaram TB ativa. Eles mostraram maior capacidade de produção de IFN- $\gamma$  frente aos estímulos utilizados, sendo significativo frente ao BCG, o que pode estar sendo responsável pela proteção, já que o IFN- $\gamma$ , através da ativação de macrófagos, é o principal mediador da imunidade protetora contra a TB. Estudos mostram que mutações no gene do IFN- $\gamma$  ou do seu receptor, em humanos, resultam no aumento da susceptibilidade à TB <sup>(28,125,126,127)</sup>. Já frente ao antígeno CFP-10, esse grupo controle apresentou uma tendência a produzir mais IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo dos pacientes ativos (Mann-Whitney; p=0,26).

Handzel e colaboradores (2007) também demonstraram essa maior capacidade de produção de IFN- $\gamma$  entre os indivíduos saudáveis PPD-positivo frente a antígenos do *M. tuberculosis*, que no caso foi o PPD, quando comparados a pacientes com TB ativa <sup>(128)</sup>. Outro estudo, realizado por Anbarasu e colaboradores (2009) observou que o grupo saudável (n=10), formado por contatos de pacientes com TB que residiam na mesma residência e por profissionais da área da saúde, produziu também significativamente mais IFN- $\gamma$  quando

comparado aos pacientes ativos (n=10), frente a vários antígenos do *M. tuberculosis*, incluindo o CFP-10 e o ESAT-6<sup>(129)</sup>.

Essa maior capacidade de produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  frente aos antígenos do *M. tuberculosis* entre os indivíduos saudáveis PPD-positivo observada no atual estudo pode ser explicada pela prévia exposição à micobacteria, já que esse grupo controle é formado por estudantes da área da saúde e que provavelmente apresentaram contato com pacientes com TB. Visto que Arend e colaboradores (2000) observaram que os indivíduos vacinados com a BCG que responderam aos antígenos ESAT-6 e CFP-10 apresentavam história prévia de exposição ao *M. tuberculosis*, enquanto que aqueles vacinados que não eram expostos ao *M. tuberculosis* não responderam aos antígenos<sup>(130)</sup>. Portanto, pode-se concluir que os indivíduos saudáveis com infecção latente pelo *M. tuberculosis* apresentam possivelmente uma memória imunológica aos antígenos da micobactéria. Pois, já que o CFP-10 não está presente no BCG, é esperado que indivíduos, mesmo vacinados, mas que não apresentaram contato com o patógeno *M. tuberculosis* não desenvolvam uma resposta imunológica a esse antígeno.

Estudos realizados em áreas endêmicas para TB, como a Índia, observaram que indivíduos saudáveis apresentavam maior resposta frente ao CFP-10 em relação a pacientes com TB ativa<sup>(131)</sup> e também em relação a indivíduos saudáveis de áreas não endêmicas<sup>(92)</sup>. Isso também foi observado com o antígeno ESAT-6 em um estudo realizado por Ravn e colaboradores (1999) com indivíduos controles na Etiópia<sup>(132)</sup>.

Turner e colaboradores (2000) demonstraram também, semelhantemente ao atual estudo, que a produção de IFN- $\gamma$  entre os pacientes ativos frente ao BCG foi significativamente menor quando comparado aos indivíduos saudáveis residentes em área endêmica para TB<sup>(133)</sup>.

Alguns indivíduos saudáveis, que apresentavam reação intradérmica positiva ao PPD, não apresentaram resposta ao antígeno CFP-10. Isso confirma a baixa especificidade do PPD e a alta especificidade do CFP-10, visto que a positividade ao PPD pode ter sido devido à vacinação ou também à exposição a micobactérias ambientais.

A baixa produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  entre os pacientes ativos pode ser explicada pela imunorregulação verificada nesses pacientes, provocada pela alta produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) encontrada nos sobrenadantes. Isso também foi observado por outros estudos<sup>(128,134,135)</sup>.

Por outro lado, outro estudo verificou que a produção de IFN- $\gamma$  frente aos antígenos ESAT-6 e/ou CFP-10 foi significativamente maior entre os pacientes ativos, sendo os valores das medianas iguais a 924 pg/ml e 408 pg/ml, respectivamente, conseguindo

diferenciar os indivíduos saudáveis dos pacientes com TB ativa <sup>(107)</sup>. Isso também foi verificado em um estudo realizado por Van Pinxteren e colaboradores (2000) <sup>(136)</sup>. Isso pode ser explicado pelo fato desses estudos terem sido realizados em áreas consideradas não endêmicas para TB e apenas os pacientes ativos serem provenientes de países endêmicos, por isso apresentavam essa maior resposta.

No atual estudo verificou-se que a produção de IFN- $\gamma$  frente ao CFP-10 não foi capaz de diferenciar os indivíduos saudáveis dos pacientes com TB pulmonar.

Os fatores que podem estar contribuindo para a variabilidade da resposta ao CFP-10 nos pacientes com TB são: a carga micobacteriana, o nível de expressão do antígeno das cepas de *M. tuberculosis* e características genéticas do processamento de antígenos e da resposta imune dos pacientes, incluindo o padrão de produção de citocinas ou os polimorfismos do HLA, das citocinas ou dos seus receptores <sup>(107)</sup>.

Como encontrado no atual estudo, Anbarasu e colaboradores (2009) também não verificaram diferença significativa na produção de TNF- $\alpha$  frente a antígenos do *M. tuberculosis*, como o CFP-10, entre os indivíduos saudáveis e os pacientes com TB ativa <sup>(129)</sup>.

A regulação negativa da resposta protetora Th1 pode ser explicada por um possível aumento das citocinas Th2, como a IL-4 e a IL-13 e/ou pelo efeito regulatório da citocina IL-10.

As citocinas Th2 IL-4 e IL-13 podem estar exercendo um efeito negativo sobre a resposta protetora contra o *M. tuberculosis* nos pacientes ativos, pois a IL-4 apresentou-se significativamente elevada em todos sobrenadantes de cultura e a IL-13 também se encontrou elevada no plasma e nos sobrenadantes de cultura das células estimuladas com PHA nesses pacientes. Além da IL-4 apresentar uma tendência de aumento entre os ativos no plasma e a IL-13 também nos sobrenadantes de cultura com CFP-10. Portanto, verificou-se entre os pacientes ativos uma maior capacidade *in vitro* de produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) e uma menor capacidade de produção de IFN- $\gamma$ .

A IL-4 é um potente estimulador da diferenciação de células Th2 e, juntamente com a IL-13, é um inibidor da resposta Th1 através da inibição da ativação de macrófagos <sup>(137,138)</sup>. Porém, ainda não está muito clara a contribuição dessas citocinas na imunorregulação existente nesses pacientes.

Estudos mostram o envolvimento da IL-4 na redução da proteção e aumento da imunopatologia. Hernandez-Pando e colaboradores (1997) observaram que camundongos pré-imunizados que passaram a desenvolver uma resposta Th2, após a infecção com *M. tuberculosis* desenvolveram uma doença mais grave, resultando na morte <sup>(139)</sup>.

Além de seu efeito sobre a eficácia da resposta Th1, a IL-4 apresenta também, em associação com o TNF- $\alpha$ , um efeito pró-fibrose no tecido, pois camundongos geneticamente

deficientes para IL-4 apresentaram além da diminuição no crescimento bacteriano a ausência dessa fibrose mediada pelo TNF- $\alpha$  <sup>(140)</sup>.

Muitos estudos têm demonstrado esse aumento da atividade Th2 apresentado por pacientes com TB ativa. Um estudo realizado por Freeman e colaboradores (2006) demonstrou que macrófagos infectados com cepas virulentas do *M. tuberculosis*, como a H37Rv, produziram preferencialmente citocinas do tipo Th2, como a IL-13 e IL-5, ambas associadas com a inibição de fagócitos <sup>(141)</sup>. Esses macrófagos também produziram IL-10, uma citocina anti-inflamatória que suprime a resposta imune de macrófagos <sup>(72)</sup>.

Van Crevel e colaboradores (2000) observaram, através de marcação intracelular de citocinas, que as células T de pacientes com TB apresentavam uma produção significativamente maior de IL-4 que os controles saudáveis PPD-positivo <sup>(142)</sup>. Além disso, Handzel e colaboradores (2007) verificaram a existência da associação da produção aumentada de IL-4 e a doença pulmonar cavitária <sup>(128)</sup>.

Por outro lado, Torres e colaboradores (1998) não observaram diferença na produção de IL-4 pelas células mononucleares cultivadas com o antígeno 30 kDa do *M. tuberculosis* entre pacientes com TB e contatos PPD-positivo, não sendo detectada a produção de IL-4 nos dois grupos de pacientes <sup>(143)</sup>.

Estudos mostram que essas citocinas Th2 atuam também impedindo a morte das micobactérias através da autofagia <sup>(144)</sup>, resultando, então, na proliferação das micobactérias e no desenvolvimento da doença.

É importante lembrar também que a imunorregulação não é apenas realizada pelas citocinas liberadas, mas também por proteínas de membrana e por contato entre as células. Esses outros fenômenos também podem estar sendo responsáveis por essa regulação observada nos pacientes com TB.

A IL-10 é uma importante citocina supressora da resposta inflamatória contra patógenos, responsável pela desativação de macrófagos e células dendríticas, além da supressão da apresentação de antígenos e da produção de citocinas inflamatórias, como o IFN- $\gamma$  <sup>(80)</sup>.

Os altos níveis plasmáticos de IL-10 em pacientes com TB ativa, comparado com indivíduos saudáveis, também foram observados em um estudo realizado por Handzel e colaboradores (2007) <sup>(128)</sup>. Esse mesmo estudo verificou ainda que os pacientes com TB crônica produziram os maiores níveis de IL-10, sugerindo que essa resposta possa ter impedido uma rápida e efetiva resposta anti-micobacteriana e, portanto, contribuído para a cronicidade da doença. Isso pode estar relacionado à própria genética desses indivíduos. Portanto, a IL-10 estaria apresentando um efeito negativo no combate ao *M. tuberculosis*,



através da inativação de macrófagos e diminuição da secreção de citocinas Th1 <sup>(145)</sup>. Porém, esse efeito negativo seria provavelmente devido a diminuição na razão IFN- $\gamma$ /IL-10, pois a ativação apropriada da citocina anti-inflamatória IL-10 é importante para a manutenção do balanço com a citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ , definindo um bom resultado da infecção pelo *M. tuberculosis* <sup>(146)</sup>. Portanto, o aumento do IFN- $\gamma$  seria regulado por um aumento da IL-10, para a prevenção de uma resposta exacerbada contra o patógeno que resultaria em um dano ao paciente.

Por outro lado, de acordo com Herrero e colaboradores (2003) pode ser também que a IL-10 esteja exercendo um efeito pró-inflamatório durante uma resposta inflamatória caracterizada pelos altos níveis de IFN- $\gamma$ , com o objetivo de eliminar o patógeno. Após essa eliminação do patógeno e o declínio da resposta imune e dos níveis de IFN- $\gamma$ , essa IL-10 presente passaria, então, a desativar as células e resolver a inflamação <sup>(147)</sup>.

Murray e Young (1999) observaram que a deficiência de IL-10 em camundongos foi importante para o aumento da resistência ao *M. tuberculosis*, porém apenas no início da infecção. A carga bacteriana após 30 dias de infecção apresentou-se similar ao grupo controle <sup>(148)</sup>. Isso sugere que outros fatores, como a IL-4, tenham o papel de inibir a morte das micobactérias, através de seus efeitos negativos sobre a atividade dos macrófagos, como a inibição da produção de NO <sup>(149)</sup>.

Os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  apresentaram-se significativamente maiores entre os pacientes ativos provavelmente pelo fato de eles estarem sob uma situação inflamatória.

O aumento dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e IL-10 em pacientes com TB em relação ao grupo controle está de acordo com dados apresentados por estudos anteriores, sugerindo que essas citocinas podem estar associadas com a TB ativa.

Hasan e colaboradores (2009) observaram resultados similares em relação aos níveis circulantes de citocinas ao comparar pacientes com TB (n=80) e indivíduos saudáveis vacinados (n=42). Verificaram que os níveis circulantes de IFN- $\gamma$  e IL-10 apresentavam-se significativamente maiores entre os pacientes com TB ativa quando comparados com os indivíduos saudáveis. Nesse estudo realizado por Hasan ficou ainda demonstrado que pacientes com TB moderada apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  maiores que os pacientes com TB leve, enfatizando o papel dessa citocina na inflamação <sup>(150)</sup>.

Morosini e colaboradores (2003) também observaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e IL-10 entre os pacientes com TB pulmonar (n=21) quando comparados com indivíduos saudáveis PPD-positivo (n=12) e também PPD-negativo (n=18) <sup>(151)</sup>.

A produção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura sem estímulo e após os estímulos de PHA e CFP-10 apresentou-se maior entre os indivíduos saudáveis. Al-attiyah e Mustafa (2008) detectaram também elevada produção *in vitro* de IL-10 entre indivíduos saudáveis frente a antígenos do *M. tuberculosis* <sup>(123)</sup>.

Essa diferença nos níveis de IL-10 no plasma e nos sobrenadantes entre os grupos de pacientes pode ser explicada pelo fato de na cultura não estar presente alguns componentes do *M. tuberculosis*, como peptidoglicanos, que poderiam estar levando ao aumento dessa citocina no plasma. Geurtsen e colaboradores (2009) observaram que o *M. tuberculosis* apresenta em sua cápsula um componente, o  $\alpha$ -Glucan, que induz a produção de IL-10 por células da resposta imune inata, as células dendríticas <sup>(152)</sup>.

Tem sido demonstrado que polimorfismos nos genes de algumas citocinas, como IL-10 e IFN- $\gamma$ , podem influenciar os níveis dessas citocinas e podem estar associados à resistência ou susceptibilidade a doenças infecciosas, incluindo a TB <sup>(137,125)</sup>. Porém, ainda há dados conflitantes em relação ao efeito desses polimorfismos em humanos <sup>(153,154)</sup>.

Nos pacientes ativos, a indução da produção de IL-10 pelo  $\alpha$ -Glucan do *M. tuberculosis* associado aos polimorfismos genéticos podem estar colaborando para os altos níveis plasmáticos de IL-10, podendo resultar na ativação ou reativação da TB, já que essa reativação está associada a uma produção elevada de IL-10 e com o aumento de células T reguladoras produtoras de IL-10. Já em relação à infecção primária, o papel da IL-10 na susceptibilidade ainda é questionável <sup>(81)</sup>.

Estudos observaram que a IL-10 e citocinas Th2, como IL-13 e IL-4, estão associadas à susceptibilidade a outras doenças infecciosas como a infecção por *Leishmania* sp. <sup>(155,156)</sup>. Salhi e colaboradores (2008) verificaram que a IL-10 apresenta um importante papel nas lesões de pele em humanos infectados com *L. braziliensis* <sup>(155)</sup>. Da mesma forma, estudos apontam a IL-10 como um dos fatores responsáveis pelo aumento da susceptibilidade à TB, enquanto que o IFN- $\gamma$  apresentaria um papel protetor <sup>(143)</sup>.

Além disso, estudos com camundongos deficientes em IL-10 e camundongos infectados com a forma virulenta da *L. major* isolado de pacientes com lesões não cicatrizadas demonstraram que a IL-10 produzida por células T CD4+ é essencial para a persistência da *L. major* na pele no local da infecção após a cicatrização espontânea de lesões dérmicas em camundongos C57BL/6 <sup>(157)</sup>.

Lindsey e colaboradores (2009) observaram que camundongos vacinados com uma espécie avirulenta de Mycobacterium, que provoca uma pequena resposta celular, geneticamente manipulada para expressar altos níveis de um antígeno imunodominante 85B,

---

foram capazes de, após a infecção com *M. tuberculosis*, reduzir a proliferação das micobactérias e apresentaram um número aumentado de células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  <sup>(158)</sup>. Isso demonstra que o estudo da resposta imune contra alguns antígenos do *M. tuberculosis* também é uma importante ferramenta para o surgimento de novas vacinas contra a TB.

Estudos recentes têm confirmado que a especificidade dos testes diagnósticos que utilizam os antígenos específicos ESAT-6 e CFP-10 é significativamente maior que a dos testes que utilizam o PPD, enquanto que a sensibilidade de ambos antígenos foi similar (comparável) a do PPD <sup>(159,160)</sup>.

Como o antígeno CFP-10 foi capaz de induzir, no nosso estudo, a produção de IFN- $\gamma$  tanto nos pacientes ativos como nos saudáveis, não foi possível diferenciar os pacientes doentes dos indivíduos saudáveis através da produção dessa citocina. Estes dados sugerem que os testes comerciais, *in vitro*, utilizados para o diagnóstico de TB através da dosagem de IFN- $\gamma$  no sangue total frente aos antígenos CFP-10 e ESAT-6, estão, provavelmente, dosando os níveis séricos dessa citocina, uma vez que nos pacientes com doença ativa, os níveis séricos foram significativamente maiores que os dos indivíduos saudáveis.

## 7 CONCLUSÕES

Observa-se em pacientes com a forma ativa, um significativo viés Th2, em detrimento de uma resposta Th1 protetora.

Neste estudo, o CFP-10 foi capaz de induzir uma maior produção de IFN- $\gamma$  nos pacientes com TB ativa e também nos indivíduos saudáveis PPD-positivo, não apresentando capacidade de diferenciar esses indivíduos.

As citocinas de padrão Th2 (IL-4 e IL-13) mostraram-se elevadas nos pacientes ativos tanto nas culturas não estimuladas quanto nas culturas estimuladas com CFP-10 e BCG.

Os dados, especialmente o balanço IL-10/IFN- $\gamma$ , apontam para a existência de um complexo modelo de imunorregulação na TB humana, provavelmente devido a fatores ambientais, genéticos e relacionados à micobactéria.

---

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5a. ed. [ S.l.] Rio de Janeiro, 2002.
2. Fine PE. BCG: the challenge continues. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33:243–245.
3. WHO-World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009. Geneva; 2009.
4. Basta PC, Camacho LAB. Teste tuberculínico na estimativa da prevalência de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em populações indígenas do continente americano: uma revisão da literatura. *Cad Saúde Pública.* 2006; 22(2):245-254.
5. Nunes C. Tuberculosis incidence in Portugal: spatiotemporal clustering. *International Journal of Health Geographics.* 2007; 6:30.
6. Bentwich Z. Good worms or bad worms: do worm infections affect the epidemiological pattern of other diseases? *Parasitol Today.* 2000; 16:312.
7. Ministério da Saúde. [homepage na internet]. Tuberculose. Situação Epidemiológica: A situação da doença no Brasil. Brasília. 2009. [acesso em 11 jun 2010]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>.
8. Bloom BR. Tuberculosis: back to a frightening future. *Nature.* 1992;358:538-9.
9. Tiruvilumala P, Reichman LB. Tuberculosis. *Annu Rev Public Health.* 2002; 23:403–26.
10. Maciel EL, Viana MC, Zeitoune RC, Ferreira I, Fregona G, Dietze R. Prevalence and incidence of *Mycobacterium tuberculosis* infection in nursing students in Vitória, Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(6):469-72.
11. Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57:641–76.

12. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:1785-1789.
13. Koneman EW. *Diagnóstico Microbiológico*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
14. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. *Micobactérias*; p. 409-425.
15. Houben ENG, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9:76-85.
16. Pieters J. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol*. 2001; 13:37-44.
17. Milburn HJ. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2001; 7:133-141.
18. Bethlem N. *Pneumologia*. São Paulo: Atheneu, 1984.
19. Kaufmann SH, Flesch IE, Munk ME, Wand-Württenberger A, Schoel B, Koga T. Cell mediated immunity to mycobacteria: a double-sided sword? *Rheumatol Int*. 1989; 9(3-5):181-6.
20. Cappelli G, Volpe P, Sanduzzi A, Sacchi A, Colizzi V, Mariani F. Human macrophage gamma interferon decreases gene expression but not replication of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of the host-pathogen reciprocal influence on transcription in a comparison of strains H37Rv and CMT97. *Infect Immun*. 2001; 69(12):7262-70.
21. Gomes MGM, Rodrigues P, Hilker FM, Mantilla-Beniers NB, Muehlen M, Paulo AC, et al. Implications of partial immunity on the prospects for tuberculosis control by post-exposure interventions. *J Theor Biol*. 2007; 248(4):608-617.
22. Ebrahim GJ. Vaccination against tuberculosis. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2006; 6(3):267-8.
23. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME, Hernandez-Pando R, et al. Human  $\beta$ -defensin-2 is expressed and associated with

- 
- Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73(8):4505-11.
24. Skamene E. Genetic control of host resistance to mycobacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1986; 124:49-66.
25. Hill AV. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2:373–400.
26. Chan J, Flynn JL. Latent and reactivation tuberculosis. *Einstein Quart J Biol Med.* 2000; 17:69-77.
27. Flynn JL, Chan J. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:93-129.
28. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon- $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993; 178:2249–54.
29. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest.* 2002; 109:693-697.
30. Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van Der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15:294-309.
31. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis.* 2003; 83(1-3):98-106.
32. Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology.* 2001; 104:99–108.
33. Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, Gingeras TR, et al. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocytic oxidase. *J Exp Med.* 2001; 194(8):1123–40.

- 
34. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:593-623.
35. Schlesinger LS, Kaufman TM, Iyer S, Hull SR, Marchiando LK. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol.* 1996; 157(10):4568-4575.
36. Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 15:760-770.
37. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2001; 166(1):249-255.
38. Liu PT, Modlin RL. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20:371-6.
39. Sundaramurthy V, Pieters J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and Infection.* 2007; 9:1671-9.
40. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000; 406(6797):782-7.
41. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:335.
42. Clemens D, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med.* 1995; 181:257-70.
43. Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol.* 2006; 8(5):719-27.
44. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: Here Today, and Here Tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(8):569-77.



- 
45. Sato K, Shimizu T, Sano C, Tomioka H. Effects of Type II Alveolar Epithelial Cells on T Cell Mitogenic Responses to Concanavalin A and Purified Protein Derivatives. *Microbiol. Immunol.* 2005; 49(10):885-890.
46. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within Type II Alveolar Cells. *Infect Immun.* 1996; 64(4):1400–1406.
47. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22:633-640.
48. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998; 282:121–5.
49. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, Landoni V, Geffner L, Musella RM, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Gamma Interferon Production by Natural Killer Cells Requires Cross Talk with Antigen-Presenting Cells Involving Toll-Like Receptors 2 and 4 and the Mannose Receptor in Tuberculous Pleurisy. *Infect Immun.* 2007; 75(11):5325–37.
50. Bhatt K, Salgame P. Host Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol.* 2007; 27(4):347-362.
51. Cho H, McMurray DN. Neutralization of Tumor Necrosis Factor Alpha Suppresses Antigen-Specific Type 1 Cytokine Responses and Reverses the Inhibition of *Mycobacterial* Survival in Cocultures of Immune Guinea Pig T Lymphocytes and Infected Macrophages. *Infect Immun.* 2005; 73:8437-8441.
52. Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78(4):318-24.
53. Wassie L, Demissie A, Aseffa A, Abebe M, Yamuah L, Tilahun H, et al. Ex vivo cytokine mRNA levels correlate with changing clinical status of ethiopian TB patients and their contacts over time. *PLoS ONE.* 2008; 3(1): e1522.
54. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun.* 2007; 75(2):820–9.

55. Bodnar KA, Serbina NV, Flynn JL. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect Immun*. 2001; 69:800–9.
56. Tascon RE, Soares CS, Ragno S, Stavropoulos E, Hirst EM, Colston MJ. *Mycobacterium tuberculosis*-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. *Immunology*. 2000; 99(3):473–80.
57. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- $\gamma$ , yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol*. 1999; 162(9):5407–16.
58. Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med*. 2001; 193:271–80.
59. Raviglione MC, Snider Jr DE, Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis: Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic. *JAMA*. 1995; 273(3):220-6.
60. Tsukaguchi K, De Lange B, Boom WH. Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha and IL-10 production by CD4(+) alpha beta TCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra. *Cell Immunol*. 1999; 194(1):12-20.
61. Macmicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:5243–48.
62. Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, Alland D, Flynn JL, Chan J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun*. 2001; 69:7711-17.
63. Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular Microbiology*. 2009; 11(8):1170-1178.
64. Yoshida N. Role of  $\gamma/\delta$  T-cells in the Peripheral Blood of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Kurume Medical Journal*. 2001; 48:175-181.
65. Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*: Similarities and differences in

---

Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J. Immunol.* 1995; 154(4):1786-96.

66. Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8<sup>+</sup> T cells primed for production of Type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* 1999; 67:3980–8.

67. Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol.* 2000; 159(1):290-297.

68. Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:15190-5.

69. Grosset J. Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:833-836.

70. Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* 2006; 208:261-9.

71. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defense in the lung. *J Pathol.* 2004; 204(2):217–228.

72. Harris J, Master SS, De Haro SA, Delgado M, Roberts EA, Hope JC, et al. Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; 128(1-3):37-43.

73. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. The Cellular Immune Response in Pulmonary Tuberculosis. *Invest Clin.* 2005; 46(4):391-412.

74. Ordway D, Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Spencer JS, Henao-Tamayo M, Harton M, et al. XCL1 (lymphotactin) chemokine produced by activated CD8 T cells during the chronic stage of infection with *Mycobacterium tuberculosis* negatively affects production of IFN- $\gamma$  by CD4 T cells and participates in granuloma stability. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(5):1221-9.

- 
75. Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 2003; 5:151–158.
76. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. The Immuno-endocrine Component in the Pathogenesis of Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; 66:166–175.
77. Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002; 168:4620–4627.
78. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol*. 1999; 162(6):3504–3511.
79. Smith SM, Malin AS, Pauline T, Lukey, Atkinson SE, Content J, et al. Characterization of human *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin-reactive CD8+ T cells. *Infect. Immun*. 1999; 67(10):5223-30.
80. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.
81. Mege J L, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6:557–69.
82. Ordway DJ, Martins MS, Costa LM, Freire MS, Arroz MJ, Krell HM, et al. Aumento da produção de IL-4: Resposta ao *Mycobacterium tuberculosis* virulento em doentes com tuberculose em estágio avançado. *Acta Med Port*. 2005; 18:27-36.
83. Bellamy RJ, Hill AV. Host genetic susceptibility to human tuberculosis. *Novartis Found Symp*. 1998; 217:3–13.
84. Shafer RW, Kim DS, Weiss JP, Quale JM. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine*. 1991; 70:384–97.
85. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. *J Bras Pneumol*. 2004; 30(Supl 1): S1-S55.

86. Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MAF, Accioly H, Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Rev Bras Epidemiol*. 2005; 8(2):142-149.
87. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Jeffries DJ, et al. Surprisingly High Specificity of the PPD Skin Test for *M. tuberculosis* Infection from Recent Exposure in The Gambia. *PLoS ONE*. 2006; Dec(1):1-8.
88. Dewan PK, Grinsdale J, Liska S, Wong E, Fallstad R, Kawamura LM. Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-blood interferon-gamma assay. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:47.
89. Bass Junior JB. The tuberculin test. In: Reichman LB, Hershfield ES. *Tuberculosis: A Comprehensive International Approach*. New York: Marcel-Dekker; 1993. p. 139-48.
90. Campos-Neto A, Rodrigues-Júnior V, Pedral-Sampaio DB, Netto EM, Owendale PJ, Coler RN, et al. Evaluation of DPPD, a single recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein as an alternative antigen for the Mantoux test. *Tuberculosis*. 2001; 81(5-6):353-358.
91. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, Litwin CM. Evaluation of an in vitro assay for interferon gamma production in response to the *Mycobacterium tuberculosis*-synthesized peptide antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD skin test. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125(3):467-73.
92. Lalvani A, Nagvenkar P, Udhwadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis*. 2001; 183(3):469-477.
93. Malkura R, Kohno H, Hirotani A, Okuda Y, Ito M, Ogura T, et al. Prospective clinical evaluation of the serologic tuberculous glycolipid test in combination with the nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1322-5.
94. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000; 356:1099-104.

- 
95. Bombarda S, Figueiredo CM, Funari MBG, Soares Júnior J, Seiscento M, Terra Filho M. Imagem em tuberculose pulmonar. *J Pneumologia*. 2001; 27(6):329-40.
96. Martins MV, Lima MC, Duppre NC, Matos HJ, Spencer JS, Brennan PJ, et al. The level of PPD-specific IFN-gamma-producing CD4+ T cells in the blood predicts the in vivo response to PPD. *Tuberculosis*. 2007; 87(3):202-11.
97. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*. 1999; 33(6):1103–1117.
98. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular Analysis of Genetic Differences between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996; 178(5):1274–1282.
99. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science*. 1999; 284(5419):1520-3.
100. Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Brosch R, Parkhill J, Barrell B, et al. Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 2001; 81:157-163.
101. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, et al. The primary mechanism of attenuation of *Bacillus Calmette-Guérin* is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:12420–12425.
102. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1996; 64:16-22.
103. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*. 1998; 144:3195–3203.
104. Brodin P, de Jonge MI, Majlessi L, Leclerc C, Nilges M, Cole ST, et al. Functional Analysis of Early Secreted Antigenic Target-6, the Dominant T-cell Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, Reveals Key Residues Involved in Secretion,

- Complex Formation, Virulence, and Immunogenicity. *J Biol Chem.* 2005; 280(40):33953–33959.
105. Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; 63(5):1710–17.
106. Andersen P, Andersen AB, Sørensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 1995; 154(7):3359-3372.
107. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, Skjøt RLV, Subronto YW, van Dissel JT, et al. Detection of Active Tuberculosis Infection by T Cell Responses to Early-Secreted Antigenic Target 6-kDa Protein and Culture Filtrate Protein 10. *J Infect Dis.* 2000; 181:1850–4.
108. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6a. ed. Brasília, 2005.
109. Thiam S, LeFevre AM, Hane F, Ndiaye A, Ba F, Fielding KL, et al. Effectiveness of a strategy to improve adherence to tuberculosis treatment in a resource-poor setting: a cluster randomized controlled trial. *JAMA.* 2007; 297(4):380-386.
110. Center For Disease Control, Prevention. Trends in Tuberculosis. United States. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2004; 53:209–214.
111. Ziv E, Daley CL, Blower SM. Early Therapy for Latent Tuberculosis Infection. *Am. J. Epidemiol.* 2001; 153:381–5.
112. Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81:34–45.
113. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet.* 2006; 367:1173–80.
114. Weir RE, Gorak-Stolinska P, Floyd S, Lalor MK, Stenson S, Branson K, et al. Persistence of the immune responses induced by BCG vaccination. *BMC Infect. Dis.* 2008; 8:9.

- 
115. Young DB, Duncan K. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *Annual Review of Microbiology*. 1995; 49:641-73.
116. Soysal A, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, et al. Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *Lancet*. 2005; 366:1443-51.
117. Bicalho HM, Gontijo CM, Nogueira-Machado JA. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *J Immunol Methods*. 1981; 40(1):115-6.
118. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*. 2002; 46:709–717.
119. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *J Infect Dis*. 2003; 187(1):117–123.
120. Torres M, Mendez P, Jimenez L, Teran L, Camarena A, Quezada R, Ramos E, Sada E. Comparison of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. *Clin. Exp. Immunol*. 1994; 96:75–78.
121. Havlir D, Wallis R, Boom H, Daniel T, Chervenak K, Ellner J. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect Immun*. 1991; 59:665–670.
122. Sánchez FO, Rodriguez JI, Agudelo G, Garcia LF. Immune Responsiveness and Lymphokine Production in Patients with Tuberculosis and Healthy Controls. *Infect. Immun*. 1994; 62(12):5673-78.
123. Al-Attayah R, Mustafa AS. Characterization of Human Cellular Immune Responses to Novel *Mycobacterium tuberculosis* Antigens Encoded by Genomic Regions Absent in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 2008; 76(9):4190–8.
124. Wangoo A, Sparer T, Brown IN, Snewin VA, Janssen R, Thole J, et al. Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. *J Immunol*. 2001; 166(5):3432–39.



125. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996; 335:1941–1949.
126. Al-Attiyah R, Madi NM, El-Shamy Abdul-salaam M, Wiker HG, Andersen P, Mustafa AS. Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 47:254–261.
127. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of Immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol*. 2002; 20:581–620.
128. Handzel ZT, Barak V, Altman Y, Bibi H, Lidgi M, Iancovici-Kidon M, et al. Increased Th1 and Th2 Type Cytokine Production in Patients with Active Tuberculosis. *Isr Med Assoc J*. 2007; 9(6):479-483.
129. Anbarasu D, Darragh H, Adhilakshmi AR, Banurekha VV, Sheela F, Hong-Lian Y, et al. Immuno-proteomic identification of human T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis* that differentiate healthy contacts from tuberculosis patients. *Mol Cell Proteomics*. In Press 2009.
130. Arend SM, Geluk A, Van Meijgaarden KE, Van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, et al. Antigenic Equivalence of Human T-Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-Specific RD1-Encoded Protein Antigens ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 and to Mixtures of Synthetic Peptides. *Infect Immun*. 2000; 68(6):3314–3321.
131. Kumar M, Sundaramurthi JC, Mehra NK, Kaur G, Raja A. Cellular immune response to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen culture filtrate protein-10 in south India. *Med Microbiol Immunol*. 2010; 199:11–25.
132. Ravn P, Demissie A, Egualé T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA. Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1999; 179:637–45.
133. Turner J, Corrah T, Sabbally S, Whittle H, Dockrell HM. A longitudinal study of in vitro IFN $\gamma$  production and cytotoxic T cell responses of tuberculosis patients in the Gambia. *Tuber Lung Dis*. 2000; 80(3), 161–169.

134. Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, et al. Healthy Individuals That Control a Latent Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Express High Levels of Th1 Cytokines and the IL-4 Antagonist IL-4 $\delta$ 2. *J Immunol*. 2004; 172:6938–6943.
135. Salina T, Morozova T. Production of gamma-interferon by blood mononuclear cells in patients with various types of a tuberculous process. *Probl Tuberk Bolezn Legk*. 2004; 10:19-21.
136. Van Pinxteren LAH, Cassidy JP, Smedegaard BHC, Agger EM, Andersen P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol*. 2000; 30:3689–98.
137. Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*. 2008; 43:26–33.
138. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Citocinas; 267-300.
139. Hernandez-Pando R, Pavön L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of Tuberculosis in Mice Exposed to Low and High Doses of an Environmental Mycobacterial Saprophyte before Infection. *Infect Immun*. 1997; 65: 3317–3327.
140. Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez MI, Orozco H, Rook G. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *Eur J Immunol*. 2004; 34(1):174-83.
141. Freeman S, Post FA, Bekker LG, Harbacheuski R, Steyn LM, Ryffel B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and H37Rv differential growth and cytokine/chemokine induction in murine macrophages in vitro. *J Interferon Cytokine Res*. 2006; 26(1):27-33.
142. Van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RHH, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis*. 2000; 181:1194–7.

143. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine Profiles for Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis and Healthy Household Contacts in Response to the 30-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998; 66(1):176–180.
144. Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 2007; 27(3):505-17.
145. Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basarba RJ, Kipnis A, Orme IM, et al. *In vivo* IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J. Immunol*. 2002; 169:6343–6351.
146. Jamil B, Shahid F, Hasan Z, Nasir N, Razzaki T, Dawood G, et al. Interferon gamma /IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2007; 87(4):279–87.
147. Herrero C, Hu X, Li WP, Samuels S, Sharif MN, Kotenko S, Ivashkiv LB. Reprogramming of IL-10 Activity and Signaling by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol*. 2003; 171:5034-5041.
148. Murray PJ, Young RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1999; 67:3087–95.
149. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol*. 1994; 55:227-33.
150. Hasan Z, Jamil B, Khan J, Ali R, Khan MA, Nasir N, et al. Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. *Scand J Immunol*. 2009; 69:259–267.
151. Morosini M, Meloni F, Marone Bianco A, Paschetto E, Uccelli M, Pozzi E, et al. The assessment of IFN- $\gamma$  and its regulatory cytokines in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Lung Tuberc Dis*. 2003; 7:994–1000.
152. Geurtsen J, Chedammi S, Mesters J, Cot M, Driessen NN, Sambou T, et al. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN:

---

involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. J Immunol. 2009; 183(8):5221-31.

153. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis. Tuber Lung Dis. 1998; 79(2):83-9.

154. López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 167:970-5.

155. Salhi A, Rodrigues Jr V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, et al. Immunological and Genetic Evidence for a Crucial Role of IL-10 in Cutaneous Lesions in Humans Infected with *Leishmania braziliensis*. J Immunol. 2008; 180:6139–48.

156. Chatelain R, Mauze S, Varkila K, Coffman RL. *Leishmania major* infection in interleukin-4 and interferon-gamma depleted mice. Parasite Immunol. 1999; 21(8):423-31.

157. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med. 2001; 194:1497–1506.

158. Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Jagannath C. Anti-tuberculosis immunity induced in mice by vaccination with *Mycobacterium smegmatis* over-expressing Antigen 85B is due to the increased influx of IFN- $\gamma$ -positive CD4 T cells into the lungs. Tuberculosis. 2009; 89: S46–S48.

159. Dheda K, Udawadia ZF, Huggett JF, Johnson MA, Rook GAW. Utility of the antigen-specific interferon-g assay for the management of tuberculosis. Curr Opin Pulm Med. 2005; 11:195-202.

160. Codecasa L, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P, Fortis C. An In-House RD1-Based Enzyme-Linked Immunospot–Gamma Interferon Assay Instead of the Tuberculin Skin Test for Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. J Clin Microbiol. 2006; 44(6):1944–1950.