

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Arioldo Carvalho Vasconcelos Junior

Análise da Resposta Imune Celular de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Ativa Contra os Antígenos Recombinantes MPT-51, GLcB, ESAT-6, Ag 85A e a Proteína do Filtrado de Cultura (CFP) de *Mycobacterium tuberculosis*.

**Orientadora:
Profª Dra Ana Paula Junqueira Kipnis**

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Arioldo Carvalho Vasconcelos Junior

Análise da Resposta Imune Celular de Pacientes com Tuberculose Pulmonar Ativa Contra os Antígenos Recombinantes MPT-51, GLcB, ESAT-6, Ag 85A e a Proteína do Filtrado de Cultura (CFP) do *Mycobacterium tuberculosis*.

Orientadora:
Prof^a Dra Ana Paula Junqueira Kipnis

Dissertação submetida ao
CPGMT/IPTSP/UFG como requisito
para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Tropical na Área
de Concentração em Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do CNPq, CAPES e FUNAPE-UFG.

Goiânia-GO, 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Vasconcelos Júnior, Arioldo Carvalho.
V331a Análise da resposta imune celular de pacientes com
tuberculose
pulmonar ativa contra os antígenos recombinantes MPT-51,
GLcB,
ESAT-6, Ag 85A e a proteína do filtrado de cultura(CFP) de
***Mycobacterium tuberculosis* / Arioldo Carvalho Vasconcelos Júnior.**

—
2008.

xii,119f : figs., tabs.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Junqueira Kipnis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás.
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia: f.81-110.

Inclui listas de abreviaturas e de figuras.

Anexos.

1. Tuberculose 2. *Mycobacterium tuberculosis* 3. Antígenos
protéicos 4. Resposta imune I. Kipnis, Ana Paula Junqueira
II. Universidade Federal de Goiás. **Instituto de Patologia
Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 616-002.5

*O segredo da vida não é fazer o que se gosta,
mas sim gostar do que se faz.*

*Dedico este trabalho, primeiramente a DEUS por ter me concedido à vida.
Aos meus pais: Arioldo e Maria Eunice, pelo amor,
dedicação e apoio nos momentos difíceis de minha vida.
A minha querida namorada: Tasmânia, pelo amor, companheirismo,
compreensão e paciência.*

Agradecimentos

A minha eterna gratidão a minha orientadora Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis, por ter me aceitado em seu laboratório, pelo empenho na orientação deste trabalho e por ter me mostrado a importância de ser um pesquisador; ao Dr. André Kipnis pelo apoio no trabalho.

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas: Eduardo, Cristina, Bruna, João, Ediane, Michelle, Rafael, Loanda, Fernando, Rogério e Hidelbrando pelo companheirismo e amizade.

A enfermeira Colombina, do Hospital Anuar Auad, pela ajuda no recrutamento de pacientes para este trabalho.

Ao Dr. João Alves pelo atendimento aos pacientes e o seu carinho com os mesmos, o que facilitou a pesquisa e o acompanhamento dos doentes.

A Dra. Elisângela Ribeiro pela grande generosidade em nos conceder seu laboratório no Hospital Araújo Jorge para a aquisição das amostras.

As doutoras Miriam Leandro Dorta e Fátima Ribeiro Dias pelo uso do seu laboratório.

A Dra. Elisângela Ribeiro, Dra. Mara Carvalhaes Silva e Dra. Aline Carvalho Batista pela contribuição na banca de qualificação.

A todos os meus amigos de outros laboratórios: Adriano, Lucas, Ludmila, Alexander, Hélio, Rosidete, Hermínio, Vânia, Yana, Lorena e Camila pela convivência.

Aos funcionários do IPTSP/UFG, José Clementino “Zezinho”, Kariny, Fernando, Divina, Aparecida pela atenção e competência.

A CAPES pela assistência financeira através da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

<i>Bibliografia: f.81-110.....</i>	<i>iv</i>
<i>1. Tuberculose 2. Mycobacterium tuberculosis 3. Antígenos</i>	<i>iv</i>

<u>protéicos 4. Resposta imune I. Kipnis, Ana Paula Junqueira</u>	<u>iv</u>
<u>II. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública III.</u>	
<u>Título.....</u>	<u>iv</u>
<u>CDU: 616-002.5.....</u>	<u>iv</u>
<u>I – Introdução Geral.....</u>	<u>1</u>
<u>1 – Histórico.....</u>	<u>3</u>
<u>2 – Epidemiologia.....</u>	<u>4</u>
<u>3 – Etiologia e Patogenia.....</u>	<u>5</u>
<u>4 – Agente Etiológico.....</u>	<u>8</u>
<u>5 – Resposta Imune Inata.....</u>	<u>10</u>
<u>6 - Resposta Imune Celular.....</u>	<u>12</u>
<u>As células Th17 representam um novo subtipo de células TCD4 e oferecem</u>	
<u>proteção contra microrganismos extracelulares. No entanto, em humanos, as</u>	
<u>propriedades das células Th17 são parcialmente conhecidas. Sabe-se que a</u>	
<u>presença de células Th17, produz IL-17 e IFN-. Os clones apresentaram expressão</u>	
<u>seletiva de IL-23R, CCR6 e fator de transcrição RORt, além de exibirem</u>	
<u>características funcionais tais como habilidade de ajudar as células B, baixa</u>	
<u>toxicidade e pobre susceptibilidade de regulação pelas células T regulatórias</u>	
<u>autólogas (ANNUNZIATO et al., 2007).</u>	<u>22</u>
<u>6.1 Formação do Granuloma.....</u>	<u>22</u>
<u>7 – Mecanismos Micobacterianos de Evasão.....</u>	<u>25</u>
<u>8 – Proteínas do M. tuberculosis.....</u>	<u>29</u>
<u>9 – Vacinas.....</u>	<u>32</u>
<u>9.1 Bacilo Calmette-Guérin (BCG).....</u>	<u>32</u>
<u>9.2 Novos modelos de vacinas.....</u>	<u>35</u>
<u>IV - Hipótese.....</u>	<u>41</u>
<u>Objetivos Específicos:.....</u>	<u>42</u>
<u>1 - População de Estudo.....</u>	<u>43</u>
<u>2 - Antígenos Protéicos.....</u>	<u>43</u>
<u>3 - Coleta de Amostras.....</u>	<u>44</u>
<u>4 - Obtenção de PBMC (Células Mononucleares do Sangue Periférico) e Cultura</u>	
<u>Celular.....</u>	<u>44</u>
<u>5 – Análise de IL-10 e IFN-γ intracelular em células T CD4 e CD8 por Citometria de</u>	
<u>Fluxo</u>	<u>45</u>
<u>6 – Análise Estatística.....</u>	<u>46</u>
<u>VII - Resultados.....</u>	<u>47</u>
<u>1 - População em Estudo.....</u>	<u>47</u>
<u>2 - Histogramas dos linfócitos T CD4+ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa</u>	
<u>e controles saudáveis positivos para IFN-γ.....</u>	<u>47</u>
<u>3 - Linfócitos T CD4+ positivos para IFN-γ nas populações em estudo, em resposta</u>	
<u>aos antígenos micobacterianos.....</u>	<u>51</u>
<u>4 - Histogramas dos linfócitos T CD8+ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa</u>	
<u>e controles saudáveis positivos para IFN-γ.....</u>	<u>51</u>
<u>5 – Análise de linfócitos T CD8 positivos para IFN-γ nas populações em estudo, em</u>	
<u>resposta aos antígenos micobacterianos.....</u>	<u>52</u>
<u>6 - Histogramas dos linfócitos T CD4+ e CD8+ positivos para IL-10 de pacientes</u>	
<u>com tuberculose pulmonar ativa e controles saudáveis</u>	<u>52</u>

<u>7 – Análise de linfócitos T CD4 e CD8 positivos para IL-10 nas populações em estudo, em resposta aos antígenos micobacterianos.</u>	<u>59</u>
<u>8- Análise comparativa de linfócitos T CD4 e CD8 positivos para IFN-γ e IL-10 entre amostras de pacientes antes e após tratamento, em resposta aos antígenos micobacterianos.</u>	<u>60</u>
<u>XI - Referências Bibliográficas.....</u>	<u>81</u>
<u>1- Termo de Consentimento dos Voluntários.....</u>	<u>111</u>
<u>2- Questionários Aplicados aos Voluntários.....</u>	<u>113</u>
<u>3- Documentos Referentes a Aprovação do Projeto de Pesquisa.....</u>	<u>115</u>

ABREVIATURAS

Ag- Antígeno

AM- Arabinomanana

APC- Célula Apresentadora de Antígeno

BAAR- Bacilo Álcool Àcido Resistente

BCG- Bacilo Calmette-Guérin

CD- Marcador de Diferenciação

Célula NK- Célula Matadora Natural

CFP- Proteína do Filtrado de Cultura

CFU- Unidade Formadora de Colônia

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CR- Receptor de Complemento

CTL- Linfócito T Cytotóxico

DC- Célula dendrítica

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

DP- Desvio Padrão

ELISA- Ensaio Imunoenzimático

ESAT-6- Early Secreted Antigenic Target (Antígeno Alvo de Secreção Primária)

Fe- Ferro

FITC- Isotiocianato de Fluoresceína

FUNAPE- Fundação de Apoio à Pesquisa

GLcB- Malato sintase G

GM-CSF- Fator Estimulador de Colônias Monocíticas e Granulocíticas

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA-DM- Antígeno Leucocitário Humano

IFN- γ - Interferon Gama

IL- Interleucina

iNOS- Óxido Nítrico Sintetase induzível

kDa- Quilodalton

LAM- Lipoarabinomanana

LM- Lipomanana

MD2- Proteína assessória extracelular

MHC- Complexo de Histocompatibilidade Principal

MIP-1- Proteína Inflamatória de Macrófagos 1
MPT-51- Proteína Micobacteriana de 27kDa com função de ligação a fibronectina
MyD88- Molécula adaptadora da ativação celular
NFκB- Fator de Transcrição nuclear kappa B
NO- Óxido Nítrico
NTM-Micobactérias não Causadoras de Tuberculose
OMS ou WHO- Organização Mundial de Saúde
PAMPs- Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBMC- Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS- Tampão de Salina Fosfato
PDIMs- Fetiodiolona Dimicocerosatato
PE- Ficoeritrina
PEcy5- Ficoeritrina cianina 5
PHA- Fitohemaglutinina
PIMs- Manosídeo Fosfatidilinositol
PNCT- Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD- Derivado de Proteína Purificada de *Mycobacterium tuberculosis*
PRR- Receptor de Reconhecimento de Padrões
RD-1- Região de Diferença Genética 1
RIC- Resposta Imune Celular
SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC- Sistema Nervoso Central
Tγδ- Linfócito T Gama Delta
TACO- Aspartato Triptofano Cisteína
TB- Tuberculose
TGF-β- Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th- Linfócito T Auxiliar
TLR- Receptor Semelhante ao Toll
TNF-α- Fator de Necrose Tumoral Alfa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos componentes da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*.09
- Figura 2.** Representação esquemática da estrutura de um granuloma.....25
- Figura 3.** Histograma de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em estímulo aos antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag85A do *Mycobacterium tuberculosis*.....50
- Figura 4.** Porcentagem de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag85A do *Mycobacterium tuberculosis* e com PHA e CFP..... 54
- Figura 5.** Histogramas de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ em estímulo a antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis*.....55
- Figura 6.** Porcentagem de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag85A do *Mycobacterium tuberculosis* e com PHA e CFP.....56
- Figura 7.** Histograma de linfócitos T CD4⁺IL-10⁺ estimulados pelo painel de antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*.....57
- Figura 8.** Histograma de linfócitos T CD8⁺IL-10⁺ estimulados pelo painel de antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*.....58
- Figura 9.** Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ positivos para IL-10 estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag85A do *Mycobacterium tuberculosis* e com PHA e CFP.....62
- Figura 10.** Porcentagem de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ de pacientes com tuberculose ativa antes e após o tratamento estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51(A), ESAT-6(B), GLcB(C) e Ag85A(D) do *Mycobacterium tuberculosis*.....63
- Figura 11.** Porcentagem de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ de pacientes com tuberculose ativa antes e após o tratamento estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51(A), ESAT-6(B), GLcB(C) e Ag85A(D) do *Mycobacterium tuberculosis*.....64
- Figura 12.** Porcentagem de linfócitos T CD4⁺IL-10⁺ de pacientes com tuberculose ativa antes e após o tratamento estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51(A), ESAT-6(B), GLcB(C) e Ag85A(D) do *Mycobacterium tuberculosis*.....65

Figura 13. Porcentagem de linfócitos T CD8⁺IL-10⁺ de pacientes com tuberculose ativa antes e após o tratamento estimulados *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51(A), ESAT-6(B), GLcB(C) e Ag85A(D) do *Mycobacterium tuberculosis*.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e epidemiológicos da população em estudo.....49

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de T CD4⁺ positivas para IFN- γ e IL-10 de controles e pacientes antes e após o tratamento.....67

Tabela 3. Média e desvio padrão do número de T CD8⁺ positivas para IFN- γ e IL-10 de controles e pacientes antes e após o tratamento.....68

RESUMO

Este trabalho avaliou a resposta imune celular dos linfócitos TCD4 e TCD8 de pacientes com tuberculose pulmonar ativa antes e após o tratamento, contra os antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag85A e o Filtrado Protéico de Cultura (CFP) de *Mycobacterium tuberculosis* atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad. A população de estudo, composta de 37 indivíduos, foi dividida em dois grupos experimentais. 1) 22 pacientes com tuberculose pulmonar, selecionados de acordo com idade, diagnóstico confirmado por baciloscopia (BAAR), radiografia evidente de tuberculose, HIV1/2 negativos. 2) 15 controles saudáveis negativos para prova tuberculínica (PT) e HIV1/2, pareados por faixa etária e sexo aos pacientes selecionados. Coletou-se aproximadamente 20 ml de sangue com heparina. O sangue total foi processado e cultivado por 96 horas na presença dos antígenos recombinantes e os linfócitos TCD4 e TCD8 foram analisados quanto à positividade para as citocinas IL-10 e IFN- γ por citometria de fluxo. As porcentagens de linfócitos responsivos aos diversos antígenos de *M. tuberculosis* apresentaram-se em geral superiores aos controles. A porcentagem dos linfócitos TCD4⁺IFN γ ⁺ ($5,63 \pm 2,43$) e IL-10⁺ ($5,83 \pm 2,19$) foram maiores em pacientes com tuberculose pulmonar ativa em comparação com os linfócitos TCD4⁺IFN γ ⁺ ($1,75 \pm 0,71$) e IL-10⁺ ($1,47 \pm 0,90$) dos controles ($p < 0,01$). Também, as porcentagens dos linfócitos TCD8⁺IFN γ ⁺ ($4,33 \pm 1,45$) e IL-10⁺ ($4,01 \pm 1,14$) dos pacientes foram maiores que os linfócitos TCD8⁺IFN γ ⁺ ($1,49 \pm 0,42$) e IL-10⁺ ($1,62 \pm 0,59$) dos controles ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa antes ($5,63 \pm 2,43$) e após ($5,0 \pm 2,0$) o tratamento nas populações celulares TCD4⁺ e TCD8⁺ positivas para IFN- γ e IL-10 quando estimuladas com o painel

de antígenos ($p > 0,05$). Com estes resultados podemos considerar que todos os antígenos testados (MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag85A) são reconhecidos pelos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Antígenos recombinantes, resposta imune celular.

ABSTRACT

This work characterized the specific cellular immune response of TCD4 and TCD8 lymphocytes against recombinant *Mycobacterium tuberculosis* at the Hospital Anuar Auad, Goiania Brazil, and constituted of two experimental groups: 1) 22 active TB patients with positive acid fast sputum, X-ray indicative of tuberculosis, smear culture positive for *M. tuberculosis* and HIV negative. 2) 15 sex and age matched healthy controls, tuberculin skin test and HIV negative. Venous blood was drawn and processed to obtain PBMC that were cultivated for 96 hours with the specific antigens ($1\mu\text{g}/10^6$ cells). TCD8 and TCD4 cells were analyzed by flow cytometry for IL-10 and IFN- γ production. In general, the percentage of positive TCD4 and TCD8 cells for IFN- γ and IL-10 were superior among the TB patients. Additionally, TCD4⁺IFN γ ⁺ ($5,63\pm 2,43$) and IL-10⁺ ($5,83\pm 2,19$) cells were significantly higher in TB patients than in healthy controls (TCD4⁺IFN γ ⁺ = $1,75\pm 0,71$ and IL-10⁺ = $1,47\pm 0,90$), ($p < 0,01$). Regarding the percentage of TCD8 cells, a higher percentage of IFN γ ⁺ ($4,33\pm 1,45$) and IL-10⁺ ($4,01\pm 1,14$) among TB patients than controls (TCD8⁺IFN γ ⁺ = $1,49\pm 0,42$ and IL-10⁺ $1,62\pm 0,59$) was observed ($p < 0,01$). TB treatment did not alter the response

to the tested antigens immediately after the treatment initiation. In conclusion, the recombinant antigens MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag85A were recognized by the specific immune response of active TB patients.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Recombinant antigens, Cellular immune response.

I – Introdução Geral

A tuberculose é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, agravado depois de 1980 pelo surgimento de casos de infecção com HIV 1/2 e o aumento da multidrogarresistência aos antibióticos. São notificados aproximadamente 9 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano, sendo que 80% destes casos se encontram nos países em desenvolvimento. O Brasil encontra-se em 16º lugar no “ranking” dos 22 países com maior índice de prevalência de tuberculose (WHO, 2006).

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* começa com a chegada dos bacilos aos alvéolos pulmonares (MOSMANN & SAD, 1996). A maioria dos pacientes que desenvolvem a tuberculose apresenta sintomas que são restritos ao pulmão (tuberculose pulmonar). Neste tipo de tuberculose os linfócitos e os macrófagos representam os dois tipos celulares mais importantes na defesa do organismo (SILVA & BOÉCHAT, 2004). Durante a infecção, os macrófagos são ativados e podem eliminar as bactérias intracelulares e participar da resposta celular do tipo Th1. As células Th1 secretam IL-2 e IFN- γ , que ativam os mecanismos microbianos dos macrófagos, enquanto que os linfócitos Th2 produzem interleucinas do tipo IL-4, IL-5 e IL-10, que dão ênfase a produção de anticorpos e inibem a ativação dos macrófagos (CORRIGAN & KAY, 1992; SILVA & BOÉCHAT, 2004). As citocinas secretadas pelos linfócitos Th1/Th2 podem mutuamente regular e inibir as funções um do outro (SHER et al., 1992). Segundo SILVA & BOÉCHAT (2004) na tuberculose existe uma predominância dessas citocinas inibitórias, mesmo na presença de citocinas

ativadoras. Por outro lado, nas infecções micobacterianas, as citocinas do tipo Th1 parecem ser essenciais na imunidade protetora (FLYNN & CHAN, 2001).

Devido ao ressurgimento e a importância da tuberculose, diversos pesquisadores tem se dedicado a estudar vários antígenos protéicos de *M. tuberculosis* com o propósito de controlar a enfermidade através do desenvolvimento de novas vacinas, descobrir proteínas antigênicas como ferramenta de diagnóstico eficaz, principalmente nos casos cujo diagnóstico é impreciso, ou ainda identificar alguns antígenos específicos de determinadas fases e tipos de tuberculose humana.

Dentre os antígenos de *M. tuberculosis* estudados encontram-se MPT-51 (MIKI et al., 2004), ESAT-6 (PORSÁ et al., 2006), GLcB (SINGH et al., 2006), Ag85A (HIBBERT et al., 1999) e Filtrado Protéico de Cultura (CFP). A escolha desses antígenos, principalmente do ESAT-6, deve-se ao fato deste ser produto da região genômica RD1 e estar presente em todas as cepas de *M. tuberculosis* e cepas patogênicas de *M. bovis* e ainda estar ausente em *M. bovis* BCG (MAHAIRAS et al., 1996; BEHR et al., 1999). Entretanto, em países com alta exposição ao *M. tuberculosis* faz-se necessária a avaliação de outros antígenos, uma vez que o ESAT-6 não é capaz de discriminar pacientes com tuberculose latente e ativa (CARDOSO et al., 2002; CHAPMAN et al., 2002).

Este trabalho avaliou a resposta imune celular dos linfócitos CD4 e CD8 aos antígenos MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag85A e CFP de pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad.

II - Revisão da Literatura

1 – Histórico

Há relatos de casos de tuberculose desde a história antiga, pois pesquisadores confirmaram a existência de tuberculose em múmias do antigo Egito que datam de 2050 a.C.(KONOMI et al. 2002; ZINK et al. 2002), porém somente em 24 de março de 1882 foi isolado o agente causador da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*, pelo cientista alemão Heinrich Hermann Robert Koch (SHIMAO 2003 ; SHIMAO 2005).

No Brasil a trajetória da tuberculose apresentou-se diferente do curso observado nos países industrializados, nos quais, a mudança epidemiológica da tuberculose efetuou-se num período anterior. Nesses países, após atingir patamares muito elevados durante o início da revolução industrial, a tendência de declínio da enfermidade começou já na primeira metade do século XIX. Antes mesmo da era microbiológica, sua incidência e mortalidade decresceram principalmente em função da melhora acentuada nas condições de vida. A introdução da quimioterapia, a partir dos anos 40, determinou nesses países impacto de menor importância do que o verificado nas regiões não industrializadas (DUBOS & DUBOS 1996). O período marcado pela mortalidade mais elevada (até os anos 40) correspondeu, no Brasil, à quase completa negligência dos órgãos e serviços públicos de saúde, os quais estiveram prioritariamente engajados na atenção a doenças epidêmicas de maior interesse para a política econômica. Nessa fase, a tuberculose praticamente só foi contemplada por esforços beneficentes e iniciativas

privadas, que não alteraram a trajetória de sua morbi-mortalidade (MONTEIRO 1995).

Durante toda a primeira metade do século XX, a doença caracterizou-se por elevadas taxas de mortalidade e foi uma das principais causas de óbito nas capitais brasileiras, em geral somente superadas pelas diarreias e pneumonias.

Estima-se que a tuberculose tenha respondido nesse período por quase 10% do total de óbitos ocorridos em São Paulo, com valores ainda maiores no Rio de Janeiro. A faixa etária desses óbitos acompanhou os padrões observados nos países de alta prevalência, com coeficientes mais elevados para os menores de 5 anos de idade, entre 20 e 49 anos e 60 anos ou mais, com predomínio do grupo de 20 a 49 anos. Em contraste com a maior prevalência da tuberculose no sexo masculino, observada nos dias atuais, a mortalidade devida à doença distribuiu-se com relativa equidade entre mulheres e homens (GALESI 1999).

2 – Epidemiologia

De acordo com dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a Tuberculose é uma pandemia com aproximadamente 9 milhões de casos novos de tuberculose por ano, levando à morte 3 milhões de pessoas, sendo que 80% destes casos se concentram em 22 países: os da África (29% de todos os casos de tuberculose), China, Bangladesh, Indonésia, Paquistão, Filipinas e Brasil (WHO 2006).

No Brasil, a tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública a qual o Brasil é classificado em 16º no ranking dos 22 países com maior índice de casos de Tuberculose sendo, juntamente com o Peru, responsável por 50% dos casos de Tuberculose na América Latina. De acordo com a OMS, em 2004 o Brasil notificou 110.000 casos novos de Tuberculose (USAID 2006).

Segundo o Programa Nacional de Controle a Tuberculose (PNCT) em Goiás há dois municípios prioritários, Goiânia e Aparecida de Goiânia. Em 2003 foram registrados 1.099 casos novos de tuberculose nestas cidades, que representam 92,3% dos casos em todo estado de Goiás.

3 – Etiologia e Patogenia

A Tuberculose Pulmonar é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, transmitida de uma pessoa doente pela eliminação de gotículas e aerossóis quando tosse e estas pequenas partículas infectantes podem permanecer suspensas no ar por períodos prolongados (JAMES et al. 2000; JOKLIK et al. 1994). A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre pela interação de fatores exógenos como o contato com um paciente infectante, duração do contato, infectividade do bacilo e o ambiente onde ocorre esse contato, uma vez que a maior possibilidade de transmissão ocorre quando pessoas doentes apresentam baciloscopia positiva, podem infectar 50% dos seus contactantes (DAFFÉ & ETTIENNE 1999).

O *M. tuberculosis* entra no organismo através do trato respiratório e se estabelece preferencialmente nos pulmões, já que é um microrganismo aeróbio e prefere locais com alta concentração de oxigênio. A tuberculose pulmonar pode ser classificada em primária e pós-primária (reativação ou secundária). A tuberculose pulmonar primária ocorre pelo contato com o bacilo, e destes, 90% desenvolvem uma resposta imune protetora levando a contenção do bacilo, outros 5% apresentarão doença primária progressiva e outros 5% apresentarão um desenvolvimento tardio da tuberculose, que se denomina Tuberculose de reativação ou secundária. A forma primária da tuberculose se observa com maior frequência em crianças e adolescentes e em 25% dos casos o foco primário é subpleural, nos segmentos médios pulmonares onde o fluxo aéreo é maior e favorece o depósito dos bacilos inalados. Na maior parte dos casos, o foco pulmonar primário consiste de apenas uma lesão. Em todos esses focos se observam infiltrados de linfócitos, macrófagos e monócitos. Os macrófagos fagocitam os bacilos e logo, por via linfática, os levam aos gânglios linfáticos ocasionando adenopatias (JAMES et al. 2000; JOKLIK et al. 1994).

Na maior parte dos casos, as lesões parenquimatosas e ganglionares curam de maneira espontânea, com calcificação, radiologicamente visíveis, o que se denomina complexo de Ghon. Algumas vezes estas adenomegalias podem comprimir os brônquios e causar uma obstrução, com uma erosão da parede brônquica e consequente disseminação da infecção. Em pacientes com transtornos imunes como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana (SIDA) e em pacientes com idade avançada, o foco primário pode se transformar em uma área de infecção ativa chamada de tuberculose pulmonar primária progressiva, que pode causar cavitação e disseminarem através dos

brônquios. Em outros casos, a primo-infecção pelo bacilo se dissemina por via linfohematogênica produzindo lesões em mucosas, gânglios linfáticos e até disseminação miliar (DAFFÉ & ETTIENNE 1999; JOKLIK et al. 1994).

Durante as primeiras fases da doença, os sinais e sintomas são inespecíficos e consistem principalmente em febre, sudorese noturna, perda de peso, anorexia, mal-estar geral e debilidade. Posteriormente a pessoa apresenta sinais como expectoração purulenta e hemoptises. A hemoptise se produz por erosão ou ruptura de um vaso sanguíneo na parede de uma cavidade. Nos casos de tuberculose inativa, a hemoptise brusca pode ocorrer devido a uma co-infecção por *Aspergillus sp.* nas cavidades residuais, formando aspergilomas (JAMES et al. 2000; JOKLIK et al. 1994).

A co-infecção *M. tuberculosis* e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é uma condição clínica epidemiológica grave. Os pacientes com HIV/SIDA apresentam um comprometimento da imunidade celular, o que favorece a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* ou a reativação de uma infecção prévia. A tuberculose pode se apresentar nestes pacientes de formas variadas de acordo com o grau de imunossupressão. Quando a imunidade está parcialmente comprometida, a tuberculose pulmonar apresenta um padrão típico de infiltrados no lóbulo superior com cavitação, sem adenopatias importantes. Nos casos em que a imunidade está muito comprometida pode-se observar uma doença cavitária, disseminada, de progressão rápida e fatal (BROOKS et al. 1999).

4 – Agente Etiológico

O *M. tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose pertencente à ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae*, são bacilos aeróbios, não formadores de esporos, sem flagelos, intracelular facultativo, medindo de 1 – 4 μm de comprimento por 0,3 – 0,6 μm de largura. Seu crescimento é dependente da disponibilidade de oxigênio, nutrientes e pH, devido a isso, para serem cultivados *in vitro* são necessários uso de meios enriquecidos, sólidos ou líquidos, como Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H10 ou 7H11 (CRUMP et al. 2003; ADLER et al. 2005).

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são bastonetes delgados, retos ou ligeiramente curvados. Caracterizam-se por serem álcool-ácido resistentes (BAAR). Essa resistência atribui-se a certos lipídeos de alto peso moleculares denominados ácidos micólicos, encontrados na parede celular (MADEGAN & PARKER 1994).

O *M. tuberculosis* apesar de não produzir toxinas apresenta uma estratégia de sobrevivência que lhe é peculiar: devido ao seu crescimento lento, consegue-se manter-se quase inativo permanecendo em estado de latência fisiológica. A natureza química da sua parede celular e sua capacidade de manter-se quase inativa, ou seja, a capacidade de permanecer em estado de latência fisiológica por décadas para depois se reativar, dificulta o diagnóstico, o tratamento e o ritmo das pesquisas (MADEGAN & PARKER 1994).

A parede celular do *M. tuberculosis* tem como principais constituintes os lipídeos, polissacarídeos e proteínas (BRENNAN & NIKAIDO 1995; DAFTE & DRAPER 1998). Os lipídeos constituem-se de um complexo de ácidos micólicos, arabinogalactanas e peptidoglicano (do inglês *mycolyl arabinogalactan-peptidoglican*, mAGP). O *M. tuberculosis* apresenta também glicolipídeos como lipoarabinomana (LAM), lipomanana (LM) que parece ser um precursor de LAM e fosfatidil inositol manosídeo (do inglês *phosphatidylinositol mannosides*, PIMs)(MCNEIL et al 1990; DAFTE & DRAPER 1998; MIKUSOVA et al 2000), que são fatores corda (como dimicolato de trealose) um dos fatores de virulência que em meio glicerinado, leva a bactéria a crescer em formato de corda (HOBDAIY 1997).

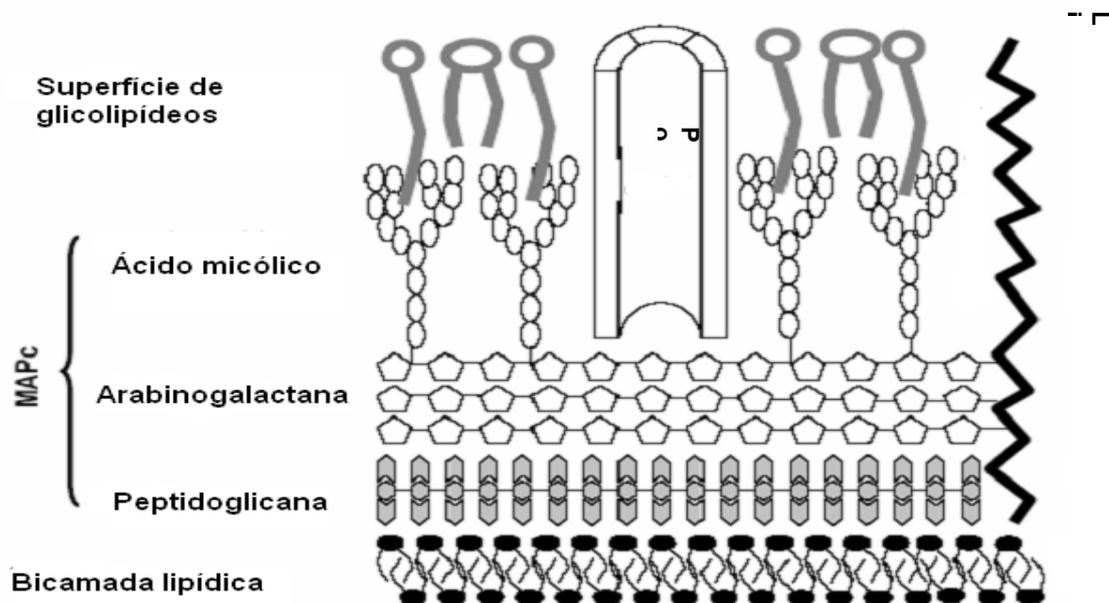


Figura 1. Esquema da parede celular micobacteriana.

Fonte: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/roese-lars-2004-06-09/HTML/chapter1.html>

O *M. tuberculosis* juntamente com *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* Bacilo Calmette Guérin (BCG) e *M. microti* formam um complexo conhecido como Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) os três primeiros desse grupo causam tuberculose em humanos e juntos com o *M. leprae* são as únicas micobactérias que causam infecções e são transmitidas de pessoa para pessoa. A identificação destes patógenos e a diferenciação de micobactérias que não causam tuberculose (NTM) são importantes para a escolha de uma terapia adequada. Esses membros do complexo Mtb são de crescimento lento, com um tempo de duplicação entre 12 – 20 h., crescem em uma temperatura entre 34 – 38°C, e formam colônias visíveis de 2 a 6 semanas (ROBERTS 1991).

5 – Resposta Imune Inata

Os mecanismos inatos de defesa que envolvem: os macrófagos alveolares, as células dendríticas, os neutrófilos, os linfócitos B, as células epiteliais, as células alveolares tipo I ou tipo II e fatores solúveis como a mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, imunoglobulinas e proteínas do complemento, apresentam a função de manter a homeostasia pulmonar e a eliminação de partículas e microorganismos que entram pelo trato respiratório (KNOWLES & BOUCHER 2002; VAN CREVEL et al. 2002).

A chegada do *M. tuberculosis* até os alvéolos pulmonares significa que ele superou a barreira mucociliar do trato respiratório, entretanto, faz-se necessário que os macrófagos alveolares reconheçam o *M. tuberculosis*. Este primeiro contato é crucial para definir o controle da infecção ou o

desenvolvimento da doença. A fagocitose do *M. tuberculosis* é realizada principalmente pelos macrófagos através de diversos mecanismos, sendo favorecida pelo surfactante A, produzido pelas células epiteliais alveolares tipo II, aumentando a interação entre a micobactéria e os macrófagos (FREGUSON & SCHELESINGER 2000).

O *M. tuberculosis* tem desenvolvido diferentes mecanismos para entrar nos macrófagos e induzir sua própria fagocitose através de diferentes receptores como: CD14, receptores Fc, quando a micobactéria é opsonizada por anticorpos e receptores de complemento, já que ao ativar a via alternativa do complemento, o componente C3b é depositado na superfície da micobactéria e é reconhecido por CR1 e CR3/CR4 presentes na superfície dos macrófagos. Na ausência do fator C3b, um componente da superfície do *M. tuberculosis* muito parecido com a molécula C4, pode unir-se diretamente a C2a para formar C3 convertase que cliva C3 e produz C3b. O C3b se liga à superfície da micobactéria e facilita a sua união com o CR1 ou com os receptores de manose que interagem com LAM, os receptores *scavengers* e os receptores para o surfactante A (ERNEST 1998; ADEREM & UNDERHILL 1999).

Alguns componentes da micobactéria (arabinogalactanas, peptidoglicanas, LAM, proteínas) podem interagir com os receptores Toll/TLR2/TLR4 dos macrófagos e induzir a produção de IL-1 β e TNF α . Tanto IL-1 β /IL-1R e o complexo TLR/CD14/MD2/Antígeno utilizam vias comuns de sinalização intracelular que incluem principalmente a molécula adaptadora

MyD88. (UNDERHILL et al. 1999; DOHERTY & ARDITE 2004; QUESNIAUX et al. 2004).

Apesar dos mecanismos de escape durante a fagocitose, a micobactéria é incluída em um fagossoma, e destruída no fagolisossoma por enzimas lisossomais e alguns de seus antígenos são processados e apresentados aos linfócitos T CD4 via (MHC II) e CD8 via (MHC I). Os macrófagos, além de serem as células efetoras, funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC) e podem definir o curso da resposta imune adaptativa (Th1 ou Th2) (RUSSEL 1999). Este é o passo de transição entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa, que se baseia no reconhecimento específico entre diferentes células e a secreção de fatores solúveis como as citocinas e quimiocinas. WANG et al. 2005 observou que o *M. tuberculosis* inibe a expressão do gene HLA-DR *in vitro*, a qual é regulada normalmente por IFN- γ , o que pode dar lugar ao desenvolvimento de uma infecção latente, podendo justificar porque alguns indivíduos controlam a infecção enquanto outros são susceptíveis.

6 - Resposta Imune Celular

O desenvolvimento da resposta imune adaptativa depende em grande parte da eficiência da resposta imune inata. Acredita-se que existem dois tipos de respostas imunes adaptativas. A resposta imune humoral (Th2) e regulatória, que não é protetora para tuberculose e que se caracteriza pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-10 e TGF- β . Estas citocinas antagonizam a resposta imune celular (RIC) tipo Th1, eficiente nas infecções causadas por microrganismos intracelulares e caracterizadas pela

produção de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- α (SCHLUGER 2001; FLYNN & CHAN 2001).

Na tuberculose pulmonar, o *M. tuberculosis* entra no organismo por via aérea e alcança os alvéolos pulmonares interagindo com células epiteliais tanto do alvéolo como do espaço peribronquial, as quais podem secretar quimiocinas e alguns peptídeos antimicrobianos que eliminarão pequena quantidade destas micobactérias. Posteriormente, a micobactéria é fagocitada pelos macrófagos residentes não ativados e controlam a infecção e ao mesmo tempo produzem citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , importantes para o recrutamento e ativação de células do sistema imunológico (SILVA & BOÉCHART et al. 2004).

A IL-12 é uma citocina de produção precoce sendo produzida principalmente pelos monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Estruturalmente, a IL-12 se encontra constituída por duas subunidades, a p35 e a p40, que se unem covalentemente para formar a molécula biologicamente ativa p70. A produção de IL-12 é induzida por citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, enquanto que IL-10, IL-4 e TGF- β têm um efeito antagonista sobre as células que produzem IL-12. A IL-12 tem um papel importante no controle da infecção, pois favorece uma resposta imune celular na tuberculose tendo funções importantes como: 1) induzir a produção de IFN- γ , pelos linfócitos T CD4 e CD8, 2) induzir a proliferação de linfócitos T CD4, 3) favorecer a expansão clonal de células Th1 e 4) aumentar a citotoxicidade dos linfócitos CD8 e das células NK (TRINCHIERI 1995; SANO et al. 1999; XING & SANTOSUOSSO 2000). Além desses efeitos, a IL-12 ativa células do sistema imune inato, mais diretamente as células NK (Natural Killer) que aumentam a

secreção de interferon-gama (IFN- γ) (MAHESHWARI et al 2002; JUNQUEIRA-KIPNIS et al 2003).

O IFN- γ age sobre os macrófagos estimulando a fagocitose e os mecanismos de ativação celular, levando a maior produção de TNF- α e a produção de mediadores da oxidação, como intermediários do oxigênio e nitrogênio, elementos importantes para a destruição da bactéria dentro do macrófago (MURRAY et al 1985; CHAN et al 1992; CIFONE et al 2001).

Estudos realizados com monócitos humanos e macrófagos de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* mortos e partículas de látex de diferentes diâmetros, por meio da técnica de RT-PCR e ELISA, demonstraram que a fagocitose constitui um sinal potente para induzir a expressão e produção de IL-12, mostrando que a expressão da subunidade p40 começa em 3 horas, alcançando níveis máximos entre 3 – 6 horas. e diminuindo entre 18 – 24 horas. (TRINCHIERI 1995; GATELY et al 1998). A IL-12 tem um papel fundamental na indução da produção de IFN- γ , citocina esta que desempenha uma importante função na resposta do tipo Th1 (Van CREVEL et al 2002; ORME 2004). Na tuberculose humana a IL-12 foi encontrada em infiltrados pulmonares (CASARINI et al 1999; TAHA et al 1997), no líquido pleural (ZHANG et al. 1994), em granulomas (BERGERON et al. 1997) e em linfadenite (LIN et al 1996). A expressão dos receptores para IL-12 também esta aumentada no sítio da infecção (ZHANG et al 1999). Por outro lado, outra citocina, a IL-1 produzida por macrófagos, promove a produção de IL-2 e a expressão do receptor para IL-2 com uma subsequente expansão

clonal de linfócitos T CD4, assim como a IL-12 produzida pelos macrófagos (ORME & COOPER 1999).

Várias subpopulações de linfócitos T estão envolvidas na resposta à tuberculose, além de mecanismos múltiplos de reconhecimento de antígenos e funções efetoras distintas no controle do *M. tuberculosis* (STENGER & MODLIN 1999). Fenotipicamente, as células T que contribuem para uma imunidade protetora incluem os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, e as T duplo negativas. Os antígenos peptídicos e não peptídicos podem ser reconhecidos pelas células T (CONSTANT et al 1994; PORCELLI 1995; NEWPORT et al 1996).

Um fato importante na resposta imune ao *Mycobacterium sp* é o mecanismo que leva a apresentação de seus antígenos. Até recentemente, acreditava-se que a resposta imune ocorria apenas aos peptídeos derivados de proteínas de *Mycobacterium sp*, que seriam apresentadas às células T, em moléculas de complexo de histocompatibilidade principal de classe I ou II (MHC I ou II). Entretanto, hoje se sabe que estruturas não protéicas como lipídeos micobacterianos, podem ser reconhecidas pelas células T de humanos em moléculas de MHC não polimórficas como a CD1 (PORCELLI et al 1992; ROSAT et al 1999).

Na resposta imune efetora ao *M. tuberculosis*, em humanos, observa-se que os linfócitos TCD4 produzem IFN- γ e podem também ter uma função citolítica, particularmente na resposta imune nos pulmões. Além dos linfócitos TCD4 e as células NK, outra fonte importante de IFN- γ são os linfócitos TCD8 (TCR $\alpha\beta$), os quais reconhecem antígenos micobacterianos em moléculas

MHC I ou CD1 em humanos, apresentando funções de citotoxicidade sobre as células infectadas através de um mecanismo dependente de grânulos que são secretados no espaço intercelular e que posteriormente entram na célula infectada para exercer sua função citolítica. Nesses grânulos se encontram proteínas importantes como as perforinas, as quais formam trímeros que se inserem na membrana celular e facilitam a entrada de granzimas e granulinas, sendo estas últimas, as responsáveis pela ativação da via das caspases que culminará com a morte por apoptose da célula infectada e consequentemente do bacilo (STENGER et al 1998; ORME & COOPER 1999; TAN et al 2000; RAJA 2004; KAUFMANN 2004).

O IFN- γ produzido por diferentes populações de linfócitos T e células NK interage com seu receptor, IFN- γ R, expresso na membrana dos macrófagos. O receptor do IFN- γ é formado por uma cadeia α e uma cadeia β (IFN- γ R1 e IFN- γ R2 respectivamente) e são responsáveis em iniciar os sinais intracelulares, o qual disparará a expressão de genes envolvidos na ativação dos mecanismos bactericidas das células fagocíticas. O IFN- γ induz à produção de intermediários do oxigênio; intermediários do nitrogênio; a acidificação do fagossoma e a fusão do fago-lisossoma; a expressão de iNOS2 para a produção de óxido nítrico utilizando L-arginina como substrato; a redução de ferro intracelular para limitar o desenvolvimento da micobactéria através da desregulação do receptor para transferrina; o aumento das moléculas MHC I e II envolvidas na apresentação de antígenos; e o aumento da capacidade de fagocitar, além de induzir a produção de IL-12 (FLYNN & CHAN 2001; BOEHM 1997).

Na tuberculose pulmonar humana existe uma correlação entre a produção de IFN- γ e as manifestações clínicas da doença, quanto mais severa a doença, níveis mais baixos de IFN- γ são produzidos pelas células mononucleares do sangue periférico (SODHI et al 1997). No entanto, à medida que se avança na quimioterapia, o IFN- γ começa a expressar-se novamente (TORRES et al 1998). A importância do IFN- γ foi confirmada quando pacientes com alterações genéticas no Receptor de IFN- γ , mostraram maior susceptibilidade a infecções disseminadas e os monócitos não foram ativados adequadamente (TORRES et al 1998).

Estudos realizados *in vitro* com células mononucleares de pacientes com infecções micobacterianas causadas por BCG, *M. avium*, *M. abscessus* e outras micobactérias atípicas têm demonstrado a existência de alterações genéticas, que incluem mutações pontuais, deleções e substituições nos genes que codificam as subunidades do receptor de IFN- γ (IFN- γ R1 e R2), gerando proteínas não funcionais que impedem a ativação dos monócitos, o qual determina a susceptibilidade a infecções disseminadas causadas por patógenos intracelulares. A disseminação neste caso pode ser consequência da falta de formação de granuloma, devido à falta de produção de citocinas, principalmente TNF- α e quimiocinas envolvidas neste processo. Também, as vezes, o IFN- γ exógeno não ativa os monócitos/macrófagos, e estas células passam a ser permissivas para a multiplicação das micobactérias (DUPUIS et al 2000; BONECINI-ALMEIDA et al 2004)

Além das alterações genéticas nos IFN- γ R, outros estudos têm demonstrado que as alterações genéticas da subunidade p40 de IL-12 e de

uma subunidade de seu receptor provocam uma produção deficiente de IFN- γ facilitando as infecções disseminadas por micobactérias (JOUANGUY et al 1999). Estes estudos evidenciam a importância da interação e co-regulação entre o IFN- γ e IL-12, uma vez que quando a produção de alguma destas citocinas e seus receptores se encontram alterados por processos infecciosos, principalmente intracelulares, ou por alterações genéticas, se observa uma resposta imune deficiente do hospedeiro diante de infecções intracelulares (DUPUIS et al 2000; JOUANGUY et al 1999).

Outra citocina importante na resposta imune celular contra o *M. tuberculosis* é o fator de necrose tumoral (TNF- α), principal mediador da resposta inflamatória aguda frente a microrganismos intracelulares, este mediador também é responsável por muitas complicações sistêmicas das infecções graves. A principal fonte celular de TNF- α são os monócitos e macrófagos ativados, mas também podem ser secretadas por linfócitos T estimulados por antígenos, células NK e mastócitos. O sinergismo do TNF- α com o IFN- γ contribui para a resistência ao *M. tuberculosis* porque induz a expressão da enzima iNOS2 nos fagócitos mononucleares e produção de óxido nítrico, óxido nítrico e nitrito, moléculas envolvidas na destruição da micobactéria. Há evidências experimentais que mostram a importância do óxido nítrico na defesa do paciente com tuberculose pulmonar humana. Estudo histoquímico tem detectado altos níveis de iNOS2 em macrófagos obtidos de lavado brônquico alveolar de pacientes com tuberculose pulmonar, quando comparados a macrófagos de pessoas saudáveis (NICHOLSON et al 1996). Uma das funções mais importantes do TNF- α é a indução da formação do granuloma, que constitui um mecanismo de defesa para evitar a disseminação

da infecção. Também o TNF- α induz a expressão de RANTES, MCP-1 e IL-8 que recrutam células do sistema imune para o local da infecção (SADEK et al 1998).

O epitélio pulmonar que cobre cerca de 70 m² do trato respiratório é outra fonte importante de quimiocinas durante a tuberculose pulmonar. Foi demonstrado que células epiteliais alveolares humanas tipo II (A549) são capazes de produzir IL-8 ao serem infectadas *in vitro* com *M. tuberculosis* H37Rv. O mecanismo de sinalização intracelular envolvido neste evento é dependente de IL-1 β produzida pelos monócitos como consequência da fagocitose do *M. tuberculosis*, tendo como fator de transcrição nuclear o NF κ B (WICKREMÁSINGHE et al 1999).

Infecção com diferentes cepas vivas de *M. tuberculosis* H37Ra, H37Rv, menos o *M. avium* induzem a produção de MCP-1 e IL-8 em níveis comparáveis, mostrando assim que a quantidade de quimiocinas produzida é independente da virulência do *M. tuberculosis*, mas dependente do crescimento de micobactérias, já que a presença de micobactérias mortas não induz a produção destas quimiocinas (WICKREMÁSINGHE et al 1999).

De acordo com DIELI et al (2000) os linfócitos T $\gamma\delta$ têm uma função importante na tuberculose pulmonar: esses linfócitos são uma das primeiras células recrutadas até o sítio de infecção e secretam quimiocinas e citocinas. A subpopulação dos linfócitos T $\gamma\delta$ V γ 9 δ 2 participam da resposta imune protetora contra o *M. tuberculosis* por produzirem citocinas que têm a capacidade de matar macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, mediante mecanismos de citotoxicidade dependente de grânulos similares aos linfócitos T CD8. No

entanto, estudos realizados com PBMC e lavado brônquico provenientes de pacientes com tuberculose têm demonstrado que a infecção por *M. tuberculosis* induz uma diminuição na população de linfócitos T V γ 9 e V δ 2 comparados com indivíduos sadios e indivíduos com doenças granulomatosas como a sarcoidose (Li et al 1996). Nesse caso, parece que esta diminuição seja devido a apoptose induzida pela via Fas/ Fas ligante dos linfócitos T V γ 9 /V δ 2 reativos a antígenos de *M. tuberculosis* (LI et al 1998; ORDWAY et al 2004; ORDWAY ET al 2005,).

O mecanismo de apoptose das células infectadas pelo *M. tuberculosis*, induzido pelos linfócitos T $\gamma\delta$, tem sido explorado como um mecanismo de evasão da resposta imune (MANFREDI et al 1998), pois tem sido demonstrado que o óxido nítrico produzido pelos macrófagos infectados e ativados impede os linfócitos T $\gamma\delta$ de morrerem por apoptose ao bloquear a acumulação intracelular de ceramidas e a ativação das caspases envolvidas neste processo sem afetar a expressão de CD95 e CD95L (SCIORATI et al 1999).

A resposta imune celular na tuberculose envolve a participação dos linfócitos T CD4 ($\alpha\beta$ TCR), CD8 ($\alpha\beta$ TCR) e linfócitos T $\gamma\delta$ que têm funções similares, mas ao mesmo tempo cada um destes linfócitos tem características particulares. A primeira particularidade é que os linfócitos T CD8 e linfócitos T $\gamma\delta$ têm uma vantagem sobre os linfócitos T CD4 porque estes não reconhecem moléculas MHC I que é expressa praticamente por todas as células do hospedeiro, enquanto que moléculas de MHC II são expressas apenas por certas células do hospedeiro, como os fagócitos mononucleares (APCs). Ainda que o *M. tuberculosis* infecta principalmente estes fagócitos, as

células epiteliais alveolares do pulmão são infectadas, e estas podem ser reconhecidas por linfócitos T CD8 e linfócitos T $\gamma\delta$ e não por linfócitos T CD4. A segunda particularidade é quanto à cinética de ativação: os linfócitos T $\gamma\delta$ são os primeiros a chegar ao local da infecção; e os linfócitos TCD4 e CD8 provavelmente não têm função efetora tão rápida, mas durante a infecção estas células aparecem na seguinte ordem: polimorfonucleares, células NK, linfócitos T $\gamma\delta$, linfócitos T $\alpha\beta$ (CD4, CD8) (CHAN & KAUFMAN 1994).

As células T regulatórias, T reg, são um subtipo de células TCD4 que são essenciais na prevenção da autoimunidade. Essas células também suprimem a resposta imune a microrganismos. Em pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, as células Treg se acumulam em elevados números em todos os locais onde as células TCD4 são encontradas, incluindo as regiões perivascular/peribronquial e nos granulomas (SCOTT-BROWNE et al., 2007a).

A regulação de eventos pró-inflamatórios na resposta imune ao *M. tuberculosis* é crítica para prevenir injúrias teciduais. Sendo assim, a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória secretada na tuberculose humana, porém pouco se sabe a respeito do modo como essa citocina é liberada (SCOTT-BROWNE et al., 2007b). A IL-10 é um mediador da diminuição do IFN- γ na resposta a doenças por patógenos intracelulares. Como os próprios patógenos induzem a produção de IL-10 pelos fagócitos mononucleares, anticorpos para esta citocina aumentam a produção de IFN- γ pelas PBMC em resposta a antígenos micobacterianos (CARVALHO et al., 1994). As micobactérias e outros patógenos intracelulares são potentes indutores de IL-

10 e o desenvolvimento da tuberculose está freqüentemente associado com a falha na produção de IFN- γ (ZHANG et al., 1995). Segundo GONG et al. (1996) o mecanismo pelo qual a IL-10 inibe a resposta imune Th1 é através de citocinas e moléculas co-estimulatórias como CTLA-4.

As células Th17 representam um novo subtipo de células TCD4 e oferecem proteção contra microrganismos extracelulares. No entanto, em humanos, as propriedades das células Th17 são parcialmente conhecidas. Sabe-se que a presença de células Th17, produz IL-17 e IFN- γ . Os clones apresentaram expressão seletiva de IL-23R, CCR6 e fator de transcrição ROR γ t, além de exibirem características funcionais tais como habilidade de ajudar as células B, baixa toxicidade e pobre susceptibilidade de regulação pelas células T regulatórias autólogas (ANNUNZIATO et al., 2007).

6.1 Formação do Granuloma

A reação granulomatosa é um padrão de reação inflamatória crônica no qual há predominância de macrófagos, com uma aparência semelhante a uma célula epitelial, neste tipo de lesão têm-se uma agregação de células epitelióides, juntamente com macrófagos e células gigantes e intensa deposição de cálcio na lesão. As células epitelióides ocupam, inicialmente, a porção central do granuloma. Na periferia, são observados linfócitos do tipo T, os quais caracterizam uma resposta de hipersensibilidade tardia, acredita-se que modulem a resposta dos macrófagos. Mais na periferia ainda prolifera fibroblastos e vasos sangüíneos, os primeiros para dar suporte a estrutura

granulomatosa e os segundos, para nutri-la. Segundo TSAI et al. (2006) o tecido granulomatoso de camundongos infectados com *M. tuberculosis* são relativamente aeróbios, sugerindo que o modelo de tuberculose persistente pode não ser o mais adequado para o estudo da resposta hipóxica de *M. tuberculosis*. Com o passar do tempo e o crescimento do granuloma, sua porção central pode sofrer necrose caseosa, devido à carência nutricional. Formam-se, então, um centro necrótico na região central e tal agregação é geralmente circundada por linfócitos e, ocasionalmente, por plasmócitos. (DANNENBERG 1991; GONZALEZ-JUARRERO et al 2001; ALGOOD et al 2005; TSAI et al 2006). O tecido granulomatoso tem estrutura organizada, cuja formação é regulada por recrutamento de células imunes específicas e que exibem relação espacial uma com a outra. O agregado de linfócitos B é uma característica proeminente tanto no camundongo quanto nos humanos.

O mecanismo que desencadeia a formação do granuloma ocorre inicialmente com uma resposta imune ao *M. tuberculosis* (WANGOO et al; 2005), após à exposição ao antígeno, o fator de necrose tumoral (TNF- α) pré-estocado é liberado pelos macrófagos, recrutando neutrófilos e monócitos circulantes. Ao mesmo tempo, o IFN- γ produzido pelas NK e T $\gamma\delta$, ativa macrófagos e células dendríticas. Essas células liberam quimiocinas, TNF- α e IL-1, as quais alteram a microcirculação local e facilita o tráfego celular para o tecido. Após algum tempo, as células dendríticas carregadas com antígenos, migram para os linfonodos drenantes, iniciando a resposta linfocítica. Essas células dendríticas produzem interleucina-12 (IL-12) e apresentam o antígeno para as células TCD4⁺ naíve (SAUNDERS et al 2002). Sobre a influência da IL-12, as TCD4⁺ virgem diferenciam-se em Th1. Estas por sua vez secretam IL-2,

que leva a expansão clonal destas células antígeno específicas. Assim estas células Th1 ativadas vão para o local onde ocorreu a alteração da microcirculação. A interação entre Th1 e macrófagos ativados através das moléculas CD28/B7, levando as células Th1 a produzirem IFN- γ , esta por sua vez ativará outros macrófagos. Estes depois de ativados se transformarão em células gigantes multinucleadas ou células epitelióides (ARDELEANU et al 1999; CIPRIANO et al 2003), que ativam os fibroblastos, os quais produzem colágeno, elastina que promoverão uma lesão endurecida e tumefeita, o granuloma (GOLDSBY et al 2000; WANGOO et al 2005).

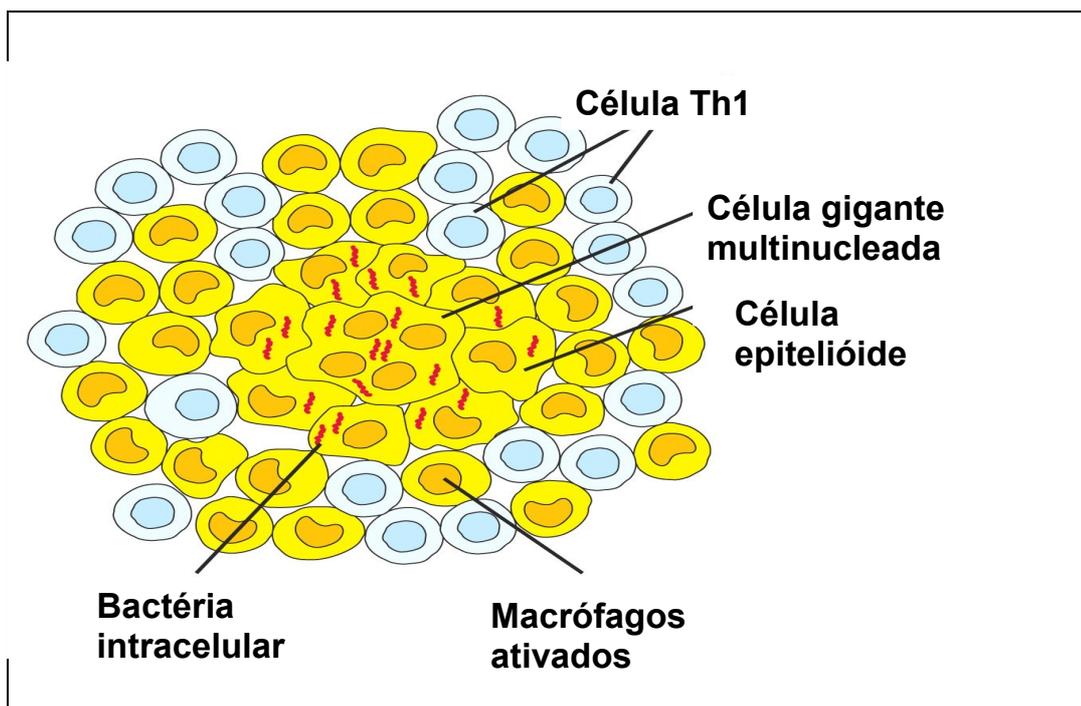


Figura 2. Principais células que formam o granuloma de tuberculose.
 Fonte:GOLDSBY et al. (2000)

7 – Mecanismos Micobacterianos de Evasão

A patogenicidade das micobactérias é multifatorial e depende dos seguintes fatores: capacidade de colonizar a superfície das mucosas, penetração nas células do hospedeiro, multiplicação no tecido hospedeiro, resistência, lesão dos tecidos e interferência nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Em relação a este último aspecto, é importante mencionar os mecanismos que utiliza o *M. tuberculosis* como estratégia para poder escapar dos mecanismos imunológicos e sobreviver nas células do hospedeiro (DAFFÉ & ETTIENE 1999). Como exemplo, observa-se que a micobactéria induz diminuição na expressão de moléculas MHC II reduzindo a apresentação de antígenos o que assegura a persistência dentro de seu nicho (HMAMA et al 1998; KEANE et al 1997).

A parede celular das micobactérias patogênicas influi notavelmente na resistência passiva aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Através de microscopia eletrônica, em células infectadas observa-se que a parede celular, vista como uma zona eletrotransparente, separa as micobactérias do conteúdo fagolisossomal, potencialmente tóxico. Presume-se que o conteúdo lipídico da parede celular impede a degradação da bactéria, pelas enzimas das células de defesa do hospedeiro assim como impede o contato das enzimas com as estruturas micobacterianas proteicas. Além disso, na parede celular existem substâncias como a superperóxido dismutase, catalase, peroxidase e o sistema tioredoxina, que são capazes de inativar radicais livres de oxigênio e outras substâncias que poderiam atravessar a parede celular da micobactéria (DAFFÉ & ETTIENE 1999; MALDONADO 1999).

Componentes específicos da parede, como o LAM, são considerados importantes imuno-moduladores que afetam a resposta imunológica do hospedeiro frente a uma infecção por micobactérias. LAM isolado de *M. tuberculosis* e *M. leprae* tem se mostrado como causa da supressão da proliferação de linfócitos T (CHATTERJEE et al 1991), interferindo também na ativação dos macrófagos mediado pelo IFN- γ (SIBLEY et al 1988). Esta molécula está envolvida na evasão aos radicais livres de oxigênio, inibe a ativação da proteína quinase (CHAN et al 1991) e fator estimulador de colônia monocíticas e granulocíticas (GM-CSF) em células humanas (BARNES et al 1992). LAM também está envolvida na produção de citocinas por células mononucleares (SIBLEY et al 1988) e na ativação do sistema complemento (HETLAND et al 1998).

A linfoproliferação pode também ser inibida de forma não específica por glicolípídios fenólicos e por fosfatidil inositol de bactérias. Estes lipídeos também são capazes de inibir a proliferação de monócitos induzidos pelos antígenos das micobactérias. A ação destas substâncias traz como consequência uma troca na produção de citocinas e a não ativação dos macrófagos, assim inibem os principais mecanismos bactericidas (MOHAGHEGHPOUR et al 1998). O composto sulfatado SL – I e componentes do complexo antigênico 85, especificamente as proteínas de 30-31kDa induzem a secreção de TNF- α pelos monócitos, que pode explicar parte das manifestações da patologia como a formação de granulomas, febre e caquexia. Também estimula a secreção de IL-1 β que ocasiona o aumento de cortisol tissular, aumento da produção de IL-10 e disfunção dos macrófagos (DAFFÉ & ETTIENE 1999; MALDONADO 1999). Entre as substâncias produzidas pelos bacilos, analisadas de cepas virulentas de *M. tuberculosis*, a mais estudada é o fator Corda ou Trehalose 6,6 dimicolato, que forma parte da parede celular. Esta substância permite que os bacilos se unam em forma paralela, compacta, formando cordões serpenteantes nos meios de cultivo. Nos tecidos vivos, esta substância atua sobre as mitocôndrias inibindo a respiração e a fosforilação oxidativa, tem atividade granulomatogênica e inibe a migração de leucócitos polimorfonucleares. Devido à trehalose 6,6 dimicolato se encontrar nas camadas mais internas da parede celular, sua atividade tóxica poderia ser exercida apenas quando as micobactérias infectantes são destruídas pelo sistema imune. A atividade desta substância é aumentada pelos sulfatados, constituintes da parede celular (DAFFÉ & ETTIENE 1999).

As micobactérias patogênicas são capazes de inibir a fusão dos fagossomas e lisossomas, este fenômeno está associado à liberação bacteriana de derivados sulfatados a partir de uma glicoproteína de sua parede celular (trehalose 2-sulfato), que detém a maturação do lisossoma no estágio de endossoma primário. Também, existe a retenção da proteína de superfície que contém aspartato e triptofano (TACO) no fagossoma primário, prevenindo a fusão com os lisossomas maduros (KEANE et al 1997). Caso ocorra a união do fagossoma com o lisossoma, as micobactérias liberam grandes quantidades de amônio e alcalinizam o conteúdo intralissossomal, inativando muitas enzimas (PACHECO et al 1992; FLYNN & CHAN 2001; STUGILL-KOSZYCKI et al 1994; ULRICH & KAUFMANN 2002). Também, recentemente se identificou que uma mutação no gene *mmpL 7*, que é responsável pelo transporte de tiocerol dimicoserosato nas micobactérias e tem um papel importante na evasão. Os ésteres de tiocerol dimicoserosato (PDIMs) (HOTTER et al 2005), presente na superfície da parede do bacilo, facilitam o crescimento e a persistência das micobactérias no tecido pulmonar (CHRISTENSEN 2000).

A micobactéria tem um requerimento obrigatório de ferro para sobreviver, enquanto que os macrófagos requerem ferro (Fe^{3+}) como co-fator para indução de mecanismos bactericidas, o qual estabelece uma competição entre a célula do hospedeiro e o *M. tuberculosis* para a aquisição desta molécula essencial. A célula adquire o Fe através do receptor transferrina (TfR) que captura o Fe extracelular e o internaliza unida a transferrina e a lactoferrina, depois este complexo se dirige ao compartimento onde se reciclam nos endossomas primários e as condições de pH facilitam a liberação do Fe da transferrina. Existem algumas estratégias que o *M. tuberculosis* tem

desenvolvido para ter acesso a esta fonte de Fe: a) o fagossoma micobacteriano está restringido em sua maturação e permanece na via de reciclagem endossomal de maneira que a micobactéria tem livre acesso ao TfR com o Fe unido a transferrina. B) a micobactéria tem moléculas especializadas que se unem ao Fe denominadas sideróforos que tem alta afinidade por Fe intracelular, e o transferem para moléculas micobacterianas denominadas micobactinas, que são fatores quelantes de Fe que competem com a ferritina e a transferrina para capturá-lo; estas se localizam na parede celular da micobactéria (WANG et al 2005). Estudos in vitro utilizando gálio que interfere no metabolismo do Fe adquirido por *M. tuberculosis*, têm demonstrado que os macrófagos humanos tratados com gálio causam a morte da micobactéria (OLAKANMI et al 2000).

Existem outros mecanismos de dano aos tecidos do hospedeiro que não estão bem esclarecidos. Entre eles se encontra a atividade hemolítica dependente de contato produzida pelas fosfolipases micobacterianas e o escape do *M. tuberculosis* dos fagossomas e a subsequente multiplicação extracelular (DAFFÉ & ETTIENNE 1999).

8 – Proteínas do *M. tuberculosis*

O MPT-51 (Rv3803c) é um antígeno de 27 KDa codificado na região FbpC1 adjacente ao gene FbpA do *M. tuberculosis* também denominado como Ag.85 D ou MPB 51 (NAGAI et al 1991; RAMBUKKANA et al 1993). Apesar de possuir 40% de homologia ao complexo Ag85 este não possui atividade micolil transferase (RINKE de WIT et al 1993; WILSON et al 2003; 2004) caracterizando-o como uma nova família não catalítica que liga-se a

fibronectina (KITAURA et al 2000). O MPT51 é expresso em outras micobactérias como *M. leprae* (RINKE de WIT et al. 1993), *M. avium* (OHARA et al 1997a) e *M. bovis* BCG (OHARA et al 1997b). Este antígeno tem se mostrado um bom marcador para diagnóstico de tuberculose principalmente em pacientes co-infectados com HIV (SINGH et al 2005).

O ESAT-6 (Rv3875) com peso molecular de 6-KDa, (do *inglês early secretory antigenic target 6*) caracterizado por Sorensen et al (1995), é uma proteína codificada na região RD-1 (do *inglês regions of difference*) (Brodin et al 2006) de várias espécies do complexo *M. tuberculosis*, exceto nos subtipos do *M bovis* BCG (SORENSE et al. 1995; MAHAIRAS et al 1996; BERTHET et al 1998). Estudos em animais infectados com *M. tuberculosis*, tratados e reinfectados, foi observado o desenvolvimento de forte resposta de células T ao ESAT-6, sugerindo que esta proteína é relevante fonte de imunidade protetora na infecção pelo *M. tuberculosis* (HAUBNER 1994; FAN et al 2006; LI et al 2006).

O gene GlcB foi identificado no *Mycobacterium tuberculosis* e codifica uma malato sintase G (MSG) (referência Rv 1837c). O antígeno GlcB é uma proteína monomérica de 80 kDa com 741 resíduos de aminoácidos, sendo homóloga a malato sintases (AceB) da bactéria Gram positiva *Corynebacterium glutamicum* e a MSG da bactéria Gram negativa *Escherichia coli*, com cerca de 60% de identidade (FLORCZYK et al 2001). Sabe-se que durante a infecção persistente pelas micobactérias, as mesmas necessitam mudar o metabolismo para o 'bypass' glioxilato. Nesta via as duas enzimas presentes são a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (GlcB). No 'bypass' glioxilato a ICL e a GlcB atuam seqüencialmente para converter isocitrato a

succinato mais glioxilato e glioxilato mais acetil-CoA a malato e CoA, respectivamente. Juntas estas duas enzimas propiciam o 'bypass' de duas etapas oxidativas do ciclo do ácido tricarboxílico, permitindo a incorporação de carbono nas cadeias durante o crescimento da maioria dos microorganismos, de acetato ou ácidos graxos como fonte primária de carbono. É fundamental salientar que os mamíferos não utilizam esta via metabólica. Especificamente a GlcB catalisa a condensação do glioxilato e acetil-CoA para formar o intermediário malil-CoA, o qual é subseqüentemente hidrolisado para liberar os produtos malato e coenzima A. Devido a importância do GlcB para o estabelecimento e a persistência da infecção pelo *M. tuberculosis*, a mesma parece ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes inibidores, principalmente tendo-se em mente que o desenvolvimento de drogas que atuem nas vias de persistência da infecção são fundamentais na luta antituberculosa. A organização 'TB Alliance' em conjunto com a 'Rockefeller University' e o laboratório 'GlaxoSmithKline' trabalham para o desenvolvimento de inibidores de malato sintase (FLORCZYK et al 2001; SMITH et al 2003).

As proteínas do complexo 85 são produzidas por *M. tuberculosis* em abundância e tem sido demonstrado que proporciona imunogenicidade nos coelhos infectados com *M. tuberculosis*, a importância e relevância destas proteínas se devem, provavelmente, ao seu papel na síntese da parede celular da micobactéria. De modo igual, demonstrou-se que quando os monócitos humanos são infectados por *M. tuberculosis*, estas micobactérias secretam o complexo 85 (WHO 2004; HAUEBNER 1994; VORDERMEIER et al 2006; SABLE et al 2007).

O cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis* resulta em acúmulo no meio extracelular de um complexo de proteínas chamado CFP. A característica mais notável dessa fração protéica é a sua imunodominância (Sonnenberg & Belisle, 1997). Segundo Seibert & Munday, o CFP são os melhores antígenos de reposição envolvidos na resposta imune à tuberculose. Tem sido observada forte resposta humoral (LAAL et al 1997) e celular (ANDERSEN 1994; ROBERTS et al 1995) contra estas frações proteicas.

9 – Vacinas

9.1 Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

A história do bacilo Calmette-Guérin (BCG) começa em 1908 quando Albert Calmette e Camille Guérin iniciaram seu trabalho a partir de uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* chamada Lait Nocard, esta foi isolada por Nocard em vaca com mastite tuberculosa. Calmette e Guérin subcultivaram o organismo cada semana em um meio de papa glicerinada, meio prevalente na época, ao qual acrescentaram bÍlis bovina para assegurar uma melhor homogeneização do cultivo. Animais de experimentação foram infectados regularmente com esta cepa que perdeu a virulencia logo no décimo quinto subcultivo e não provocou lesões nos coelhos e cobaias (BENENSON 1997; WHO 2004).

Em 1921 depois de 13 anos e 230 subcultivos, o BCG havia perdido sua virulência em animais. O primeiro menino imunizado com BCG em julho de 1921 foi um recém-nascido cuja avó tinha tuberculose (MARTIN 2005, BLOOM et al 1999, GRANGE et al 1993). Nesse mesmo ano, utilizou-se pela primeira

vez na França a BCG por via oral, com fins de vacinação. Desde então foram administradas mais de 3.000 milhões de doses no mundo. A BCG foi incorporada dentro do esquema de vacinação infantil em 1974 no Brasil (BENENSON 1997).

Da cepa original do BCG foram produzidas várias cepas “filhas”. As cepas recentes de BCG foram mantidas como cultivos frescos através de uma série de subcultivos em um meio de papa-bilis ou papa-Sauton. Esta repetição de subcultivos resultou em cepas de BCG que diferem entre si. Apresentam características heterogêneas *in vitro* como a morfologia da colônia, a viabilidade em meios de cultivo, composição e atividade bioquímica, resistência a drogas, imunogenicidade em animais e humanos, e virulência em animais (ABOU-ZEID et al., 1987). Em 1950 a Organização Mundial de Saúde (OMS) em um esforço para limitar a variabilidade genética entre cepas de BCG, promoveu uma série de recomendações para sua produção. A homogeneidade da cepa de vacinas pode manter-se com o uso de organismos que não são mais de quatro gerações do primeiro lote de bacilos (WHO 2004, MANDELL et al. 1995). Em 1982 a responsabilidade para o controle da qualidade internacional das vacinas de BCG foi confiada ao ‘States Serum Institute’ em Copenhagem, o qual supervisiona a padronização de BCG, distribui bacilos e realiza treinamento para a produção de vacinas (WHO 2004; MANDELL et al. 1995).

Desde 1985 tem-se realizado estudos de controle de caso utilizando diferentes cepas de BCG, têm se observado que a eficácia da vacina é em torno de zero a 80% (SMITH, 1987). Em crianças, a proteção estimada é de 52 a 100%, para a prevenção de meningite tuberculosa, e de 2 a 80% na

prevenção de tuberculose pulmonar (ROMANUS, 1975; PADUNGCHAN et al., 1986; TIDJANI et al., 1986). Entretanto, poucos estudos têm calculado a eficiência em pessoas que receberam vacinação na vida adulta. De 1968 a 1971 foi realizada uma prova controlada quanto à proteção da vacinação com BCG no sul da Índia e ficou demonstrado que não houve eficácia de proteção em adultos ou crianças, após cinco anos da vacinação. Decorridos 15 anos foi realizada nova avaliação e a proteção foi de 17% em pessoas que foram vacinadas quando crianças (TRIPATHY, 1987).

A vacina está contra indicada para pacientes com HIV, recém-nascidos com peso menor que dois quilogramas, pacientes imunocomprometidos, ou que apresentam alguma afecção cutânea grave, aqueles que estão submetidos a algum tratamento prolongado com esteróides ou drogas imunossupressoras e doenças infecciosas como sarampo e varicela, mulheres grávidas e pessoas com prova de PPD positivo. Para os indivíduos HIV positivos, com ausência de sinais clínicos, a vacinação não é considerada uma contra indicação (PAUL & FINE 2001). A vacina de BCG é geralmente administrada para proteger contra a tuberculose, no entanto tem se notado que ela confere proteção contra hanseníase (20-80%); também há evidências que a BCG confere proteção contra infecção por *M. ulcerans* e contra doenças glandulares atribuídas a outras micobactérias em particular o *M. avium-intracellulare* (PAUL & FINE 2001).

Quanto à variabilidade da eficácia da vacina BCG, várias hipóteses tem sido propostas, uma destas é que infecção anterior com uma micobactéria não tuberculosa confere proteção contra a tuberculose ativa. Isto foi demonstrado

com provas realizadas em áreas onde as micobactérias não tuberculosas eram prevalentes, resultando uma baixa eficácia da vacina. Outros sugerem que uma infecção prévia com micobactérias pode aumentar ou diminuir a imunidade protetora (PAUL & FINE 2001; HUEBNER 1994).

9.2 Novos modelos de vacinas

Esforços para modificar o *Mycobacterium bovis* do BCG ou o *M. tuberculosis* por tecnologia do DNA recombinante com o fim de produzir uma nova vacina atenuada contra a tuberculose estão em progresso. Um destes métodos consiste na expressão de uma variedade de antígenos heterólogos no *M. bovis* (PAUL & FINE 2001; HUEBNER 1994). Outro método seria eliminar os genes do *M. tuberculosis* responsáveis pela virulência ou pela sua sobrevivência no interior dos macrófagos.

A seguridade da BCG é uma preocupação crescente, devido à alta prevalência de infecção por HIV. Para prevenir os efeitos adversos da BCG em indivíduos imunocomprometidos, bactérias modificadas têm sido propostas. Os resultados mostram que estas cepas são seguras em camundongos com imunodeficiência severa combinada e demonstrou a mesma proteção nos camundongos normais susceptíveis à tuberculose, sugerindo que este poderia ser um método mais seguro de vacinação (HUEBNER 1994).

As proteínas CFP-10 (Rv3874), GroES (Rv3418c) e complexo 85 já foram usadas como antígenos recombinantes, e sua capacidade para promover uma resposta proliferativa de células T humanas tem sido estudada. Estes antígenos foram similares ao induzir resposta Th1 protetora em camundongos, sugerindo assim que nenhum deles são imunodominantes

(SEIBERT & MUNDAY, 1932; HUEBNER, 1994). Também o ESAT-6 (Rv3875) caracterizado por SORENSEN *et al.* (1995), tem sido amplamente utilizado para a produção de vacinas (SOSENSEN *et al.* 1995; MAHAIRAS *et al.* 1996; BERTHET *et al.* 1998). Foi confirmado por BRANDT *et al.* (2000) que avaliaram o potencial do ESAT-6 em modelo de vacina e demonstraram que a vacinação com este antígeno induz resposta de célula T e proteção semelhante à obtida com o BCG. RIGANO *et al.* (2006) utilizando plantas transgênicas (*Arabidopsis thaliana*) para expressarem uma proteína de fusão contendo o antígeno ESAT-6 do *M. tuberculosis* e uma enterotoxina (LTB) da *Escherichia coli* (LTB-ESAT-6), elaboraram ração para camundongos e os imunizaram por via oral. Após o desafio com *M. tuberculosis*, apesar do aumento na produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ dos linfonodos mesentéricos, não se observou uma boa proteção. Estes resultados sugerem que além de ser imunogênica, uma boa vacina depende da via de administração para ser protetora.

Tem sido demonstrado que as proteínas do complexo 85 proporcionam imunogenicidade em coelhos infectados com *M. tuberculosis*. A importância e relevância destas proteínas se devem, provavelmente, ao seu papel na síntese da parede celular da micobactéria. De modo igual, demonstrou-se que quando os monócitos humanos são infectados por *M. tuberculosis*, estas micobactérias secretam as proteínas do complexo 85. Esta propriedade poderia ser vantajosa para desenvolver uma vacina, visto que a liberação destas proteínas é de suma importância para o processamento intracelular deste patógeno via MHCII (WHO 2004; HUEBNER 1994, VORDERMEIER *et al.* 2006, SABLE *et al.* 2007). A imunização de camundongos utilizando plasmídeo de DNA expressando o Ag85 induz a resposta imune humoral e mediada por células, conferindo

significante proteção, quando desafiados com *M. tuberculosis* e BCG (HUYGEN et al., 1998).

O MPT-51 (Rv3803c) tem se mostrado um bom marcador para diagnóstico de tuberculose, principalmente em pacientes co-infectados com HIV (SINGH et al. 2005). AOSHI (2005) descreveram um sistema de expressão retroviral que permitem que peptídeos grandes e pequenos serem expressos no citoplasma e, portanto, serem apresentados por moléculas MHC de classe I. Os autores imunizaram células T de camundongos com vacina de DNA expressando MPT-51 contra linhagens celulares MHC-I compatíveis. Estas células foram capazes de expressar de 120-140 aminoácidos da molécula de MPT-51. Segundo os autores, o sistema de expressão retroviral pode ser adaptado para expressão de epítomos de células T reconhecidos em doenças infecciosas e contra antígenos de células tumorais. A Mtb 72F foi a primeira vacina recombinante contra TB, testada em humanos (SHEIKY et al 2004). Essa proteína é obtida da fusão dos antígenos Mtb39 e Mtb32, e foi testada como subunidades vacinais (SKEIKY et al 2004) e na estratégia de “primer-boost” como reforço a BCG (BRANDT et al 2004).

Uma nova abordagem em vacinas que atualmente vem sendo empregada na busca de um substituto para a BCG são as vacinas de DNA. A possibilidade de usar vacinas de DNA é uma alternativa arriscada, construída para codificar vários antígenos, os quais podem ser selecionados para que não interfiram nas provas de sensibilidade cutânea. A seleção do antígeno usado nas vacinas de DNA está limitada pela imunogenicidade da proteína. Várias vacinas de DNA contendo plasmídeo com genes de antígenos micobacterianos como os membros das micolil-transferase (complexo 85) (HUYGEN 1998) e

proteínas do choque térmico (Hsp60, 65, 70) (LOWRIE & SILVA 2000, FERRAZ *et al.* 2004, LOWRIE 2003, JOHANSEN *et al.* 2003), tem sido extensivamente testado contra tuberculose em modelos animais. As vacinas de DNA não somente geram Th1 específicos como também TCD8, nos quais são consideradas importantes na proteção contra tuberculose. Associou-se a proteção neste caso, à produção do fenótipo CD8/CD44^{hi} INF- γ , que foi predominante após a infecção (LOWRIE *et al.* 1994; SILVA *et al.* 1996; BONATO *et al.* 1998; SILVA *et al.* 1999, LOWRIE *et al.* 1999).

M. Vaccae e *M. microti* vivos, tem sido sugerido como candidatos a vacina da tuberculose, mas quando utilizados em animais tem mostrado grande variabilidade na proteção (de BRUYN & GARNER 2003). Recentemente, *M. tuberculosis* mutante com defeito em um lipídeo micobacteriano (*Mtb drrC*) mostrou ser mais protetor que a BCG quando administrado em camundongos (PINTO *et al.* 2004).

Vetores vivos, como as vacinas virais recombinantes ou *Salmonella* modificada contendo genes imunodominantes de *M. tuberculosis*, são candidatos à vacina que tem mostrado boa proteção em modelos animais (MCSHANE *et al.* 2001; MOLLENKOPF *et al.* 2001). As vacinas virais recombinantes expressando Ag85A (MVA 85A) têm sido testadas pré-clinicamente usando diferentes estratégias de vacinação em humanos (Homólogas ou Heterólogas) sendo a primeira candidata a vacina a entrar na fase de testes clínicos 1. Entretanto, este tipo de vacina ainda tem problemas em provocar resposta imune contra o vetor, limitando o número de possíveis imunizações (MCSHANE *et al.* 2004).

D' SOUZA et al (2002) em um modelo de tuberculose experimental usou uma vacina com os antígenos Ag85 A, Ag85B ou PstS-3 de *M. tuberculosis* encapsulados em lipossomos catiônicos em camundongos, e verificaram que houve indução de resposta imune celular e humoral, sendo protetora em ambas vias de imunização (intramuscular e intranasal). Após a quarta semana de infecção, o Ag85 promoveu quase meio log de proteção (CFU de 5,8 comparada com 5,5 do BCG).

Conquanto estes antígenos tenham sido testados em ensaios experimentais como antígenos vacinais na infecção animal, a capacidade imunogênica destes e de outros antígenos na resposta imune celular de pacientes com tuberculose ativa ainda não foi esclarecida.

III - Justificativa

Embora a ciência tenha avançado muito, a tuberculose pulmonar continua a ser um dos principais problemas de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) acredita que um terço da população mundial está infectada com o bacilo e que surgem a cada ano aproximadamente 8,8 milhões de novos casos, resultando em 2 a 3 milhões de mortes a cada ano. Destas, 80% estão concentradas nos países em desenvolvimento, onde os recursos são limitados (WHO 2006). No Brasil os números são alarmantes. Em 2002, foram notificados 96.323 casos novos e são estimados 50 milhões de brasileiros infectados pelo bacilo da TB. A taxa anual de incidência notificada no Brasil em 2002 foi de 44,5 por 100.000 habitantes, no Estado de Goiás 21,34 e em Goiânia 23,5 para o mesmo período (USAID 2006). Esta grande incidência se deve a fatores como: descuido dos governos no controle da doença, programas de controle de tuberculose mal administrados, pobreza, crescimento e migração populacional, resistência do patógeno às drogas e o significativo aumento de casos do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Deve-se ressaltar que a tuberculose representa o principal fator de risco para mortalidade entre indivíduos com infecção pelo HIV (USAID 2006).

A identificação da imunogenicidade de proteínas recombinantes do *M. tuberculosis* pela resposta imune celular humana permitirá a seleção de novos candidatos a vacinas de subunidades protéicas.

IV - Hipótese

Se os antígenos protéicos MPT-51, GlcB, Ag85A ESAT-6 e CFP são expressos em altas concentrações quando o *M. tuberculosis* é submetido *in vitro* a condições de estresse que mimetizam o interior de uma célula, estes antígenos devem ser processados e apresentados aos linfócitos T de indivíduos com tuberculose ativa induzindo resposta imune específica.

V – Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa contra os antígenos protéicos recombinantes MPT-51, GlcB, ESAT-6, Ag.85A e as Proteínas do Filtrado de Cultura (CFP) do *M. tuberculosis* para caracterizar sua imunogenicidade.

Objetivos Específicos:

- Avaliar o padrão de reconhecimento dos antígenos protéicos recombinantes MPT-51, GlcB, ESAT-6, Ag.85A e as Proteínas do Filtrado de Cultura (CFP) por linfócitos T CD4 e CD8 positivos do sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa.
- Determinar se os antígenos são capazes de induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 e CD8 de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.
- Determinar se os antígenos são capazes de induzir a produção de IL-10 por linfócitos T CD4 e CD8 de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.
- Comparar a resposta imune celular T CD4 e CD8 dos pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento.

VI - Material e Métodos

1 - População de Estudo

A população de estudo composta de 37 indivíduos foi dividida em dois grupos experimentais: 1. 22 Pacientes com tuberculose pulmonar ativa, selecionados de acordo com os critérios de inclusão como: idade variando entre 22 e 63 anos, apresentando diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa confirmado por baciloscopia (BAAR), radiografia evidente de tuberculose e a prova tuberculínica (PT). 2. 15 Controles saudáveis, pareados por faixa etária e sexo aos pacientes selecionados. Para melhor classificação dos controles, os mesmos foram submetidos à prova tuberculínica. Os indivíduos foram recrutados no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia-Go entre 2005 e 2007 onde todos concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para inclusão no estudo. Os critérios de exclusão foram: indivíduos portadores de imunodeficiência ou infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Dentre os 22 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, oito foram acompanhados durante todo o tratamento (seis meses) e no máximo duas semanas após este período, os indivíduos foram recrutados para a avaliação da resposta imune celular.

2 - Antígenos Protéicos

Os antígenos recombinantes MPT-51 (Rv 3803c), ESAT-6 (Rv 3875), Ag85A (Rv3804c), GLcB (Rv 1837c) e CFP (Culture Filtrate Proteins) foram

produzidos pela Universidade Norte-Americana do estado do Colorado (Colorado State University) e cedido ao Laboratório de Imunopatologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Goiás mediante o convênio firmado pelo contrato de N° NO1-AI – 75320.

3 - Coleta de Amostras

Indivíduos TB positivos incluídos na pesquisa doaram 20 ml de sangue periférico coletados com heparina, antes e após o tratamento. Estas amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

4 - Obtenção de PBMC (Células Mononucleares do Sangue Periférico) e Cultura Celular

O sangue total foi diluído em solução salina 0,9% estéril (1:2) em seguida pipetado cuidadosamente em 3 vezes o volume em solução de Ficoll-Paque™ (Amersham Biosciences) sendo posteriormente centrifugado a 1000 g por 20 minutos a 4°C formando assim uma interface entre os líquidos (anel branco), onde foi coletado o anel leucocitário usando pipeta pasteur. Após a transferência para um novo tubo de poliestireno foi adicionado salina 0,9%, e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 xg a 4°C. Após ressuspender as células em meio RPMI completo (RPMI Médium 1640 GIBCO™ + 0,15% de Bicabornato de sódio , 10% de soro bovino fetal, 1mg/ml de L-glutamina 2mM SIGMA®, 100 UI/ml de Penicilina-estreptomicina SIGMA®,

1% de Piruvato de sódio SIGMA[®], 1 mg/ml de Aminoácidos não essenciais 100X SIGMA[®]). A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 por orifício, após a contagem em câmara de Neubauer. Foram pipetados 200 µl da suspensão celular em cada orifício da placa de cultura celular (Cell Wells[™]) de 96 orifícios em poliestireno, com PHA a 1 µg/ml (Phytohemagglutinin GibcoBRL Cat. N° 10576-015 Life Technologies[™]) e os antígenos MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag 85A e CFP na concentração de 1 µg/ml. As placas foram incubadas em estufa 5% de CO₂ a 37°C por 96 horas.

5 – Análise de IL-10 e IFN- γ intracelular em células T CD4 e CD8 por Citometria de Fluxo

As culturas de PBMC foram tratadas com monensina para o bloqueio do complexo de golgi (Golgi Stop BD[™]) e incubadas por 6 horas a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Após incubação, foram acrescentados 200 µl por orifício de PBS e azida sódica e nova incubação por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a 5000 xg por 5 minutos a 4°C, as suspensões celulares foram divididas em dois grupos de eppendorfs um para o painel 1 onde foram pipetados 10 µl de anti-CD8 PE-Cy5 (Ficoeritrina cianina 5 - BD Phamingen[™]) e o outro para o painel 2 onde foram pipetados 10 µl de anti-CD4 PE-Cy5 - BD Phamingen[™]. Após incubação por 30 minutos a 4°C, fixaram-se as suspensões celulares com PBS paraformoldeído 0,4%; azida sódica 0,1% por 15 minutos a 4°C. Depois de centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos, 100 µl de Perm Wash (PERMA/WASH[™] Buffer 10x stock) foi adicionado a cada tubo, que foram incubados por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação a 5000 xg por 5 minutos a

4°C, 10 µl de anti-IFN γ FITC (Isotiocianato de fluoresceína 2.0 µg/ml) e 10 µl de anti-IL-10 PE (Ficoeritrina) foram adicionados e os tubos foram incubados por 30 minutos a 4°C. Em seguida foi acrescentado Perm wash 1X e centrifugado em 5000 xg por 5 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em PBS, azida sódica 0.1%. As aquisições foram realizadas em citometro de fluxo (BD FAC Scalibur, San Jose, Califórnia) do Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás).

6 – Análise Estatística

Para análise da aquisição foi utilizado o programa Summit® V3.1. A tabulação e construção dos gráficos foram feitas através dos programas GraphPad Prism 4 Microsoft® e Excel®. Para a análise estatística foram utilizados o teste de variância (Kruskal Wallis) e teste *t* de student, considerado $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

VII - Resultados

1 - População em Estudo

A **Tabela 1** mostra o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes incluídos neste trabalho. A maioria dos pacientes com TB selecionados foi do sexo masculino com idade média de 36 anos (22-63). Alguns pacientes não souberam informar se foram vacinados ou não com BCG e não apresentavam cicatriz vacinal que confirmasse imunização por via intradérmica. Devido à possibilidade deles terem sido vacinados na década de 60 e 70, quando a vacinação era por via oral, os mesmos foram classificados como sem informação (SI) (**Tabela 1**). A maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar era positiva para prova tuberculínica (PT), enquanto todos os controles saudáveis eram PT negativa (**Tabela 1**).

2 - Histogramas dos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e controles saudáveis positivos para IFN- γ

Para a definição da população de linfócitos T CD4 nas culturas de PBMC estimulados ou não com antígenos, cada amostra foi adquirida e analisada no programa Cell quest (BD, Biosciences).

As células foram digitalizadas quanto ao tamanho (FFC) e granulosidade (SSC) e a população celular com tamanho e granulosidade menor que 250 foi selecionada em uma janela como a população total de linfócitos. Foram adquiridos 10 mil eventos para todas as populações celulares e cerca de 70% das células adquiridas foram incluídas nesta janela. Com esta seleção realizada, após a definição na escala logarítmica das células FL-3(CD4-CD8PE-Cy5) positivas (neste caso com fluorescência maior que 10^2), as células foram analisadas quanto à fluorescência no canal FL-1(IFN- γ FITC). Nas **figuras 3 A** e **B** apresentamos um exemplo dos histogramas obtidos de um paciente com tuberculose pulmonar ativa comparado com um indivíduo saudável.

Tabela 1: Dados clínicos e epidemiológicos da população em estudo

Grupos	Controles ^a N=15	TB ^b N=22
Sexo (M/F)	9/6	15/7
Mediana da idade (anos)	28(19-59)	36(22-63)
BCG (vacinados/SI*)	15	19/3
PT (positivos/negativos/SI*)	0/15/0	16/6/0

^aControles saudáveis: Prova Ttuberculínica negativa, HIV negativos e com baixo risco de outras doenças imunossupressoras, pareados por sexo e idade (± 6 anos) com os pacientes tuberculosos.

^bTuberculose ativa: Indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa, com diagnóstico confirmado por baciloscopia ou cultura e aqueles em que o médico, com base nos dados clínico-epidemiológicos e no resultado de exames complementares, firmou o diagnóstico de tuberculose.

*SI-não informados pelo indivíduo.

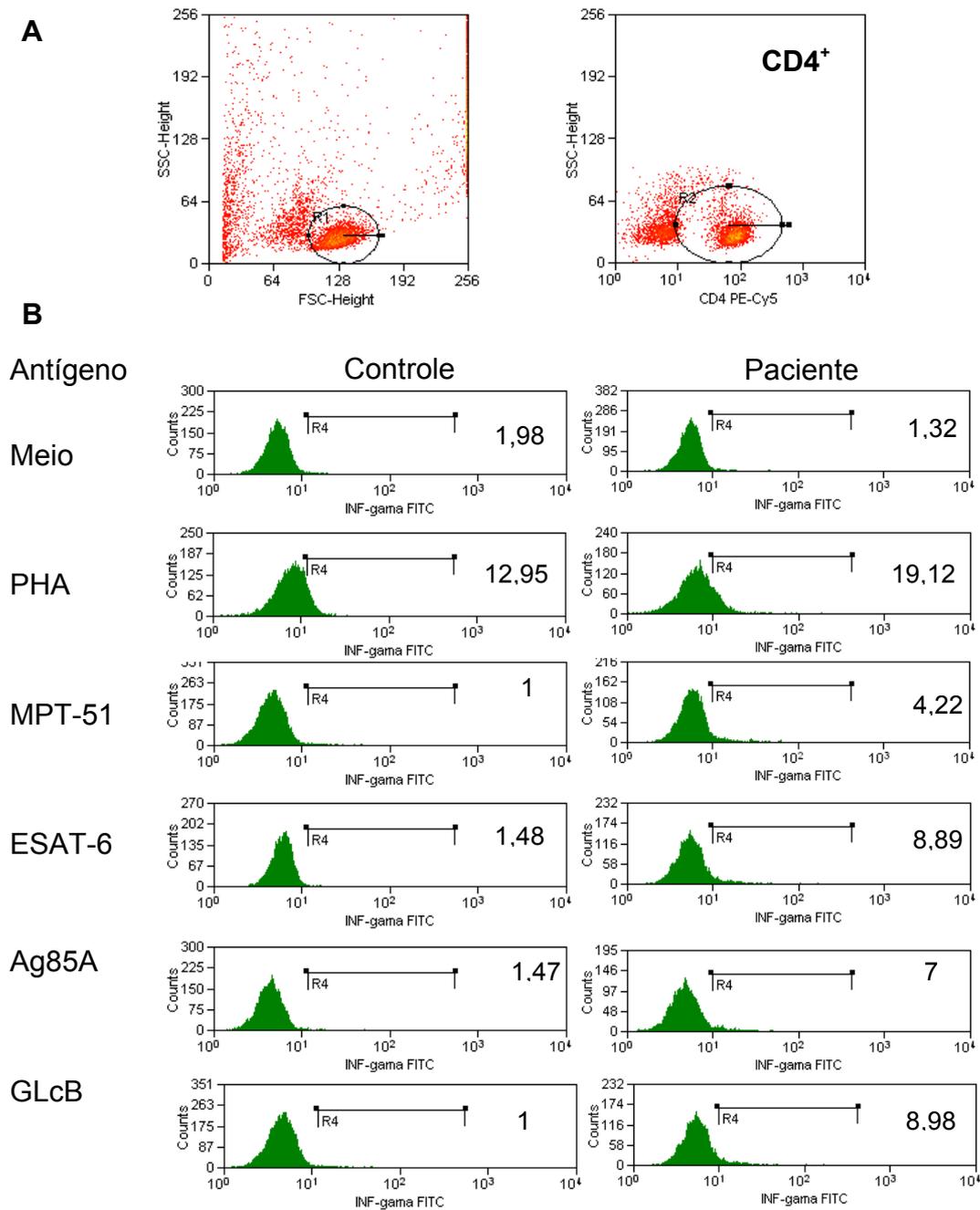


Figura 3: Eventos adquiridos na janela de linfócitos (R1= Linfócitos totais, R2= Seleção dos linfócitos T CD4⁺) (A), histogramas de células T CD4⁺IFN γ ⁺ de um controle saudável e um paciente com tuberculose pulmonar pareados por sexo e idade (\pm 6 anos) em estímulo a antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* (B).

3 - Linfócitos T CD4⁺ positivos para IFN- γ nas populações em estudo, em resposta aos antígenos micobacterianos.

Buscando caracterizar a resposta induzida pelo painel de antígenos, avaliou-se a presença de células T CD4⁺ positivas para IFN- γ em resposta aos antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag85A e Filtrado Protéico de Cultura (CFP) de *M. tuberculosis* por citometria de fluxo, em indivíduos saudáveis (**Figura 4A**) e com tuberculose pulmonar ativa (**Figura 4B**).

A porcentagem de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ em pacientes com tuberculose pulmonar ativa (MPT-51= 5,25 \pm 2,47, ESAT-6= 5,63 \pm 2,43, CFP= 5,38 \pm 2,15, GLcB= 4,72 \pm 2,10, Ag85A= 3,23 \pm 0,75) foi maior que os controles saudáveis (MPT-51= 1,76 \pm 0,75, ESAT-6= 1,75 \pm 0,71, CFP= 1,53 \pm 0,81, GLcB= 1,89 \pm 0,71, Ag85A 1,60 \pm 0,69) para todos os antígenos ($p < 0,01$). Observou-se que PBMC de pacientes com tuberculose pulmonar quando estimuladas com Ag85A apresentaram menor porcentagem de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ em relação a todos os antígenos testados (**Figura 4**).

4 - Histogramas dos linfócitos T CD8⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e controles saudáveis positivos para IFN- γ

Para a análise da população de linfócitos T CD8⁺, utilizou-se uma janela considerando a granulosidade e o Log de fluorescência acima de 10² no canal

FL-3 (CD8 PE-Cy5) (**Figura 5A**). A população de T CD8⁺IFN- γ ⁺ foi demonstrada por meio de histograma (**Figura 5B**).

5 – Análise de linfócitos T CD8 positivos para IFN- γ nas populações em estudo, em resposta aos antígenos micobacterianos.

Sabendo-se que as células T CD8 são também importantes na resposta efetora contra patógenos intracelulares, analisou-se por citometria de fluxo as células T CD8 IFN- γ ⁺ em resposta ao painel de antígenos micobacterianos em indivíduos saudáveis (**Figura 6A**) e indivíduos com tuberculose pulmonar ativa (**Figura 6B**). A porcentagem de T CD8⁺IFN- γ ⁺ foram maiores em pacientes com tuberculose pulmonar ativa (MPT-51= $3,78 \pm 2,02$, ESAT-6= $4,33 \pm 1,45$, CFP= $3,46 \pm 1,64$, GLcB= $4,46 \pm 2,70$, Ag85A= $4,34 \pm 1,92$) quando comparadas com indivíduos saudáveis (MPT-51= $1,33 \pm 0,61$, ESTA-6= $1,49 \pm 0,42$, CFP= $1,22 \pm 0,59$, GLcB= $1,58 \pm$, Ag85A= $1,65 \pm 0,66$) ($p < 0,01$) (**Figura 6**).

6 - Histogramas dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ positivos para IL-10 de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e controles saudáveis

As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram selecionadas através de janela de seleção considerando a granulosidade e o Log de fluorescência acima de 10^2

no canal FL3. Os histogramas das **Figuras 7A-B, 8A-B**, demonstram a porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para IL-10.

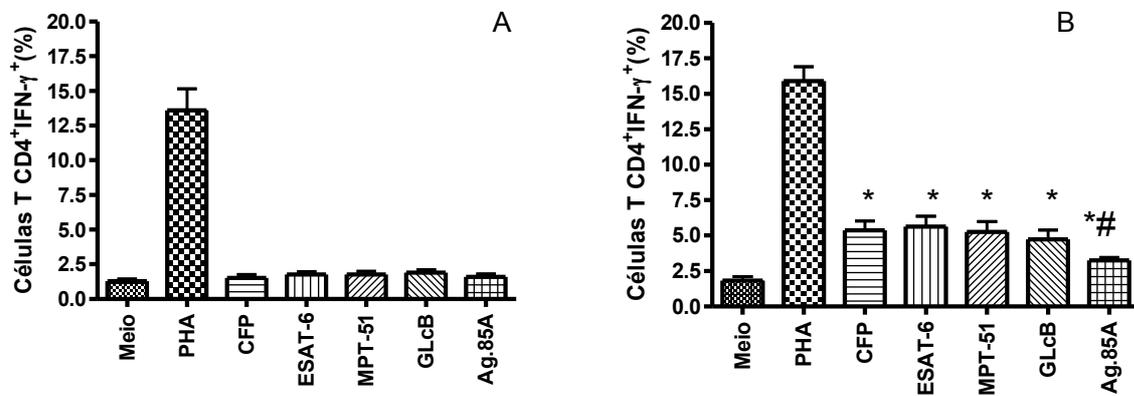


Figura 4: Porcentagem de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ estimulados *in vitro* com o mitógeno PHA e os antígenos ESAT-6, MPT-51, GLcB, Ag85A e CFP do *Mycobacterium tuberculosis*. **A.** Controles saudáveis. **B.** Pacientes com tuberculose pulmonar.

* Diferença significativa entre controle e paciente, $p < 0,01$.

Diferença significativa entre o antígeno 85A e os demais antígenos, $p < 0,01$.

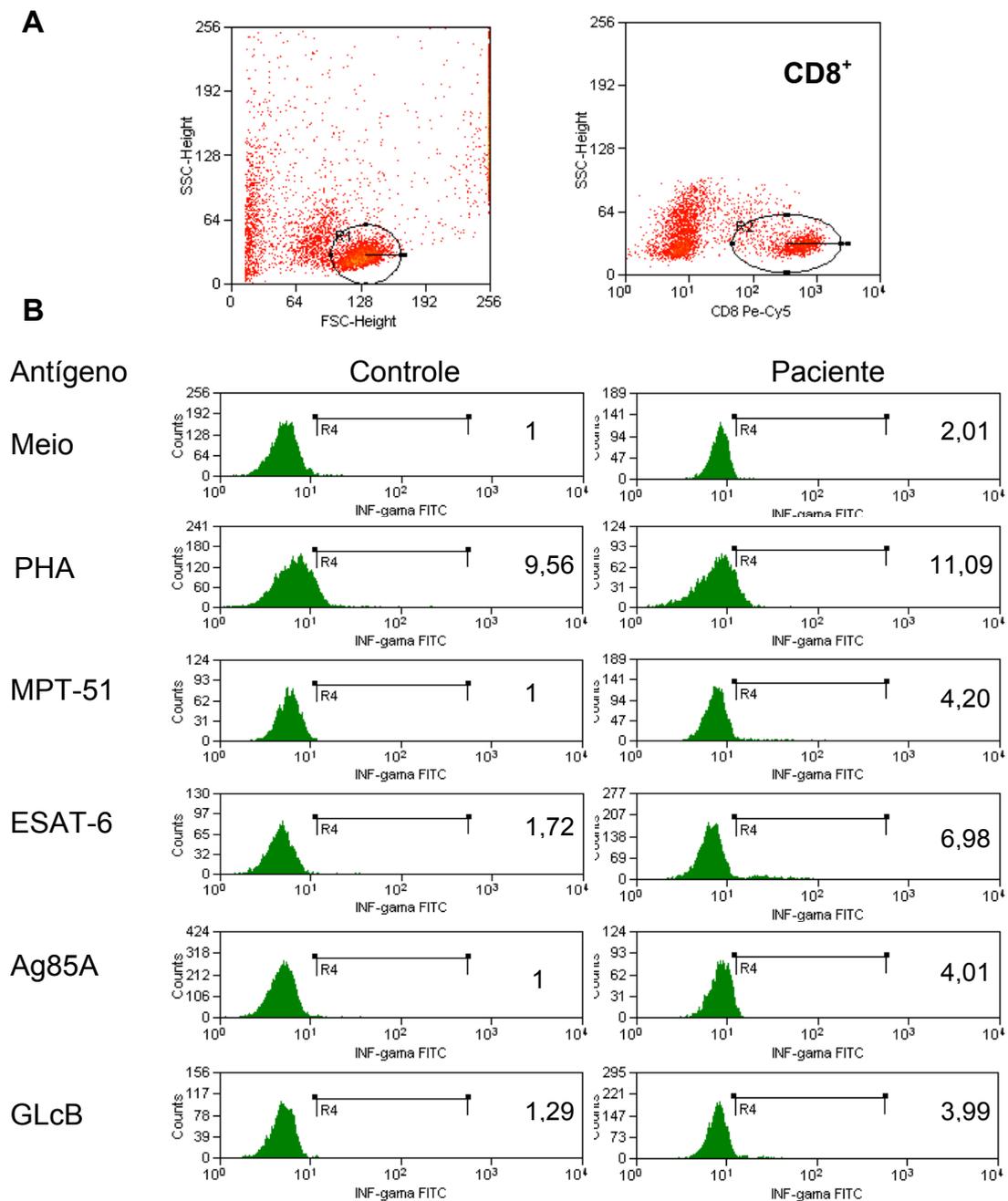


Figura 5: Eventos adquiridos na janela de linfócitos (R1= Linfócitos totais, R2= Seleção dos linfócitos T CD8⁺) (A), histogramas de células T CD8⁺IFN γ ⁺ de um controle saudável e um paciente com tuberculose pulmonar pareados por sexo e idade (\pm 6 anos) em estímulo a antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* (B).

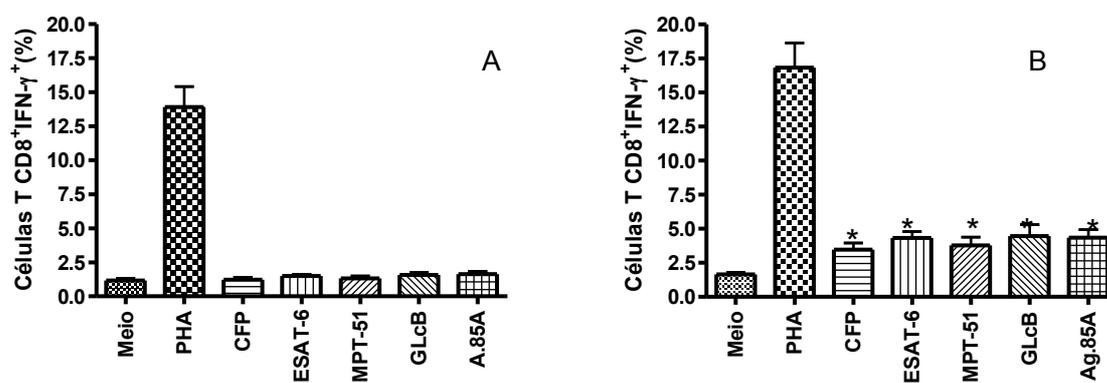


Figura 6. Porcentagem de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ estimulados *in vitro* com o mitógeno PHA e os antígenos ESAT-6, MPT-51, GLcB, Ag85A e CFP do *Mycobacterium tuberculosis*. **A.** Controles saudáveis. **B.** Pacientes com tuberculose pulmonar.

* Diferença significativa entre controle e paciente, $p < 0,01$.

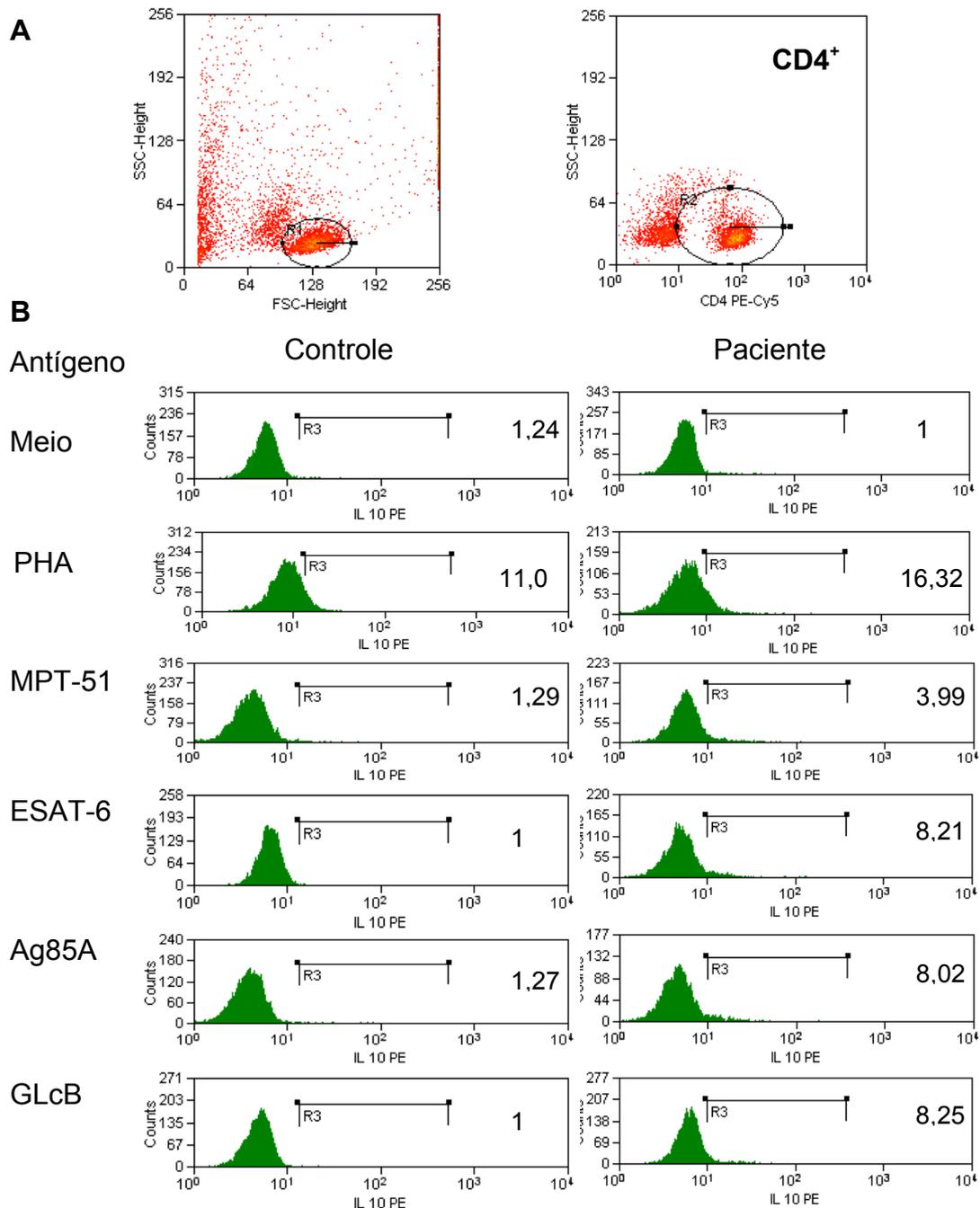


Figura 7: Eventos adquiridos na janela de linfócitos (R1= Linfócitos totais, R2= Seleção dos linfócitos T CD4⁺) (A), histogramas de células T CD4⁺IL-10⁺ de um controle saudável e um paciente com tuberculose pulmonar pareados por sexo e idade (± 6 anos) em estímulo a antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* (B).

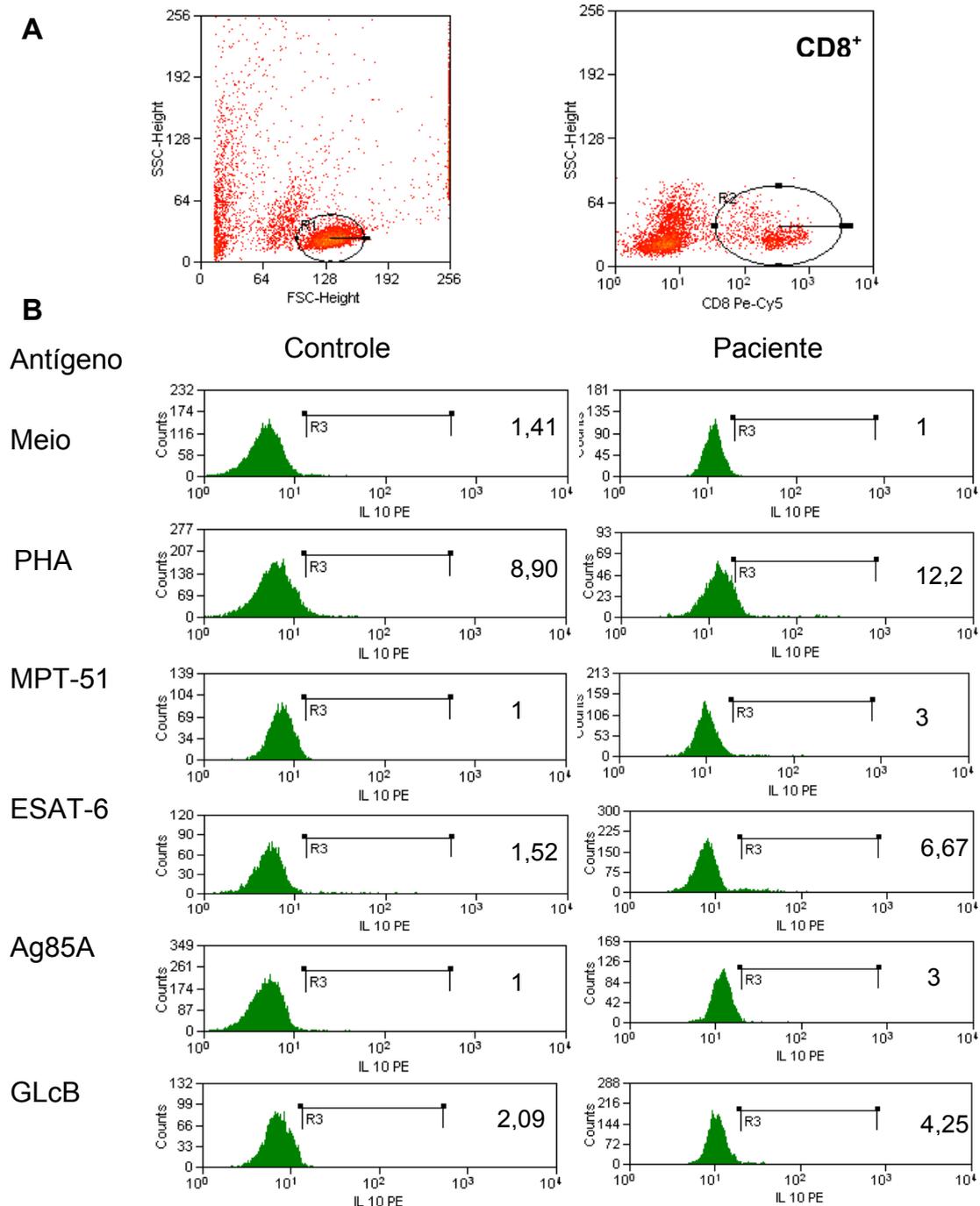


Figura 8: Eventos adquiridos na janela de linfócitos (R1= Linfócitos totais, R2= Seleção dos linfócitos T CD8⁺) (A), histogramas de células T CD8⁺IL-10⁺ de um controle saudável e um paciente com tuberculose pulmonar pareados por sexo e idade (± 6 anos) em estímulo a antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* (B).

7 – Análise de linfócitos T CD4 e CD8 positivos para IL-10 nas populações em estudo, em resposta aos antígenos micobacterianos.

À análise da população de linfócitos T CD4 e CD8 e citocinas intracelulares foi realizada através de Citometria de Fluxo para avaliar a resposta imune específica aos antígenos recombinantes.

A porcentagem de células TCD4 efectoras IL-10 positivas após estímulo com antígenos recombinantes do *M. tuberculosis* nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa (MPT-51= $5,20 \pm 2,64$, ESAT-6= $5,83 \pm 2,19$, CFP= $5,66 \pm 2,28$, GLcB= $4,92 \pm 2,29$, Ag85A= $3,62 \pm 1,04$) foi maior que nos controles saudáveis (MPT-51= $1,92 \pm 0,86$, ESAT-6= $1,47 \pm 0,90$, CFP= $1,59 \pm 0,86$, GLcB= $2,31 \pm 1,26$, Ag85A= $1,95 \pm 1,23$) ($p < 0,01$) (**Figura 9A**). A porcentagem das células TCD4 positivas para IL-10 nos pacientes com tuberculose, quando estimuladas com o Ag85A, foi menor quando comparadas aos demais antígenos testados ($p < 0,01$) (**Figura 9B**).

As células T CD8 positivas para IL-10 apresentaram o mesmo padrão observado nas células T CD4 onde a porcentagem destas células foram maiores nos pacientes doentes (MPT-51= $3,50 \pm 1,51$, ESAT-6= $4,01 \pm 1,48$, CFP= $3,78 \pm 1,27$, GLcB= $4,93 \pm 2,89$, Ag85A= $3,90 \pm 1,34$) quando comparados com as dos controles saudáveis (MPT-51= $1,15 \pm 0,42$, ESAT-6= $1,62 \pm 0,59$, CFP= $1,25 \pm 0,67$, GLcB= $1,53 \pm 0,49$, Ag85A= $1,95 \pm 0,48$) ($p < 0,01$) (**Figura 9C, 9D**).

8- Análise comparativa de linfócitos T CD4 e CD8 positivos para IFN- γ e IL-10 entre amostras de pacientes antes e após tratamento, em resposta aos antígenos micobacterianos.

A comparação entre as porcentagens de células TCD4 e TCD8 IFN- γ positivas, após estímulo com antígenos recombinantes de *M. tuberculosis*, nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa recém diagnosticados e após-tratamento estão representadas nas figuras **10** e **11**. Não houve diferença significativa antes e após o tratamento na população celular de T CD4 e TCD8 positivas para IFN- γ quando estimuladas com os antígenos MPT51, ESAT-6, GLcB e Ag85A ($p>0,05$).

A porcentagem de células TCD4 e TCD8 IL-10 positivas após estímulo com antígenos recombinantes do *M. tuberculosis* nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes e após o tratamento, estão representadas nas figuras **12** e **13**. Não houve diferença significativa antes e após o tratamento na população celular de TCD4 e TCD8 positivas para IL-10 quando estimuladas com os antígenos MPT51, ESAT-6, GLcB e Ag85A ($p>0,05$).

As porcentagens de células TCD4⁺IL-10⁺, TCD4⁺IFN γ ⁺ e TCD8⁺IL-10⁺, TCD8⁺IFN γ ⁺ estão demonstrados nas **Tabelas 2 e 3**.

Nos pacientes antes do tratamento os linfócitos TCD4⁺IL-10⁺ estiveram nas seguintes proporções: 5,20 \pm 2,64; 5,83 \pm 2,19; 3,62 \pm 1,04; 4,92 \pm 2,29; 5,66 \pm 2,28 quando estimulados com MPT-51, ESAT-6, CFP, GLCB E Ag85A, respectivamente. No pós-tratamento essas células estiveram marcadas nas

seguintes proporções: $4,19 \pm 1,97$; $3,43 \pm 0,72$; $5,07 \pm 2,36$; $4,72 \pm 1,87$; $5,24 \pm 1,90$ estimuladas com os mesmos antígenos.

Na avaliação da resposta dos linfócitos TCD4⁺IFN- γ ⁺ (**Tabela 2**), encontrou-se nos pacientes uma porcentagem de $5,25 \pm 2,47$ quando estimulados com MPT-51, $3,23 \pm 0,75$ com ESAT-6, $5,38 \pm 2,15$ com CFP, $4,72 \pm 2,10$ com GLcB e $3,23 \pm 0,75$ com Ag85A. No pós-tratamento (**Tabela 2**) a porcentagem foi de $4,2 \pm 1,59$; $5,47 \pm 2,28$; $5,0 \pm 2,0$; $4,49 \pm 1,75$ e $2,72 \pm 0,75$ quando estimulados com os mesmos antígenos. Quanto a porcentagem das células TCD8⁺IL-10⁺ e TCD8⁺IFN- γ ⁺ (**Tabela 3**) também não houve diferença significativa entre antes e após o tratamento.

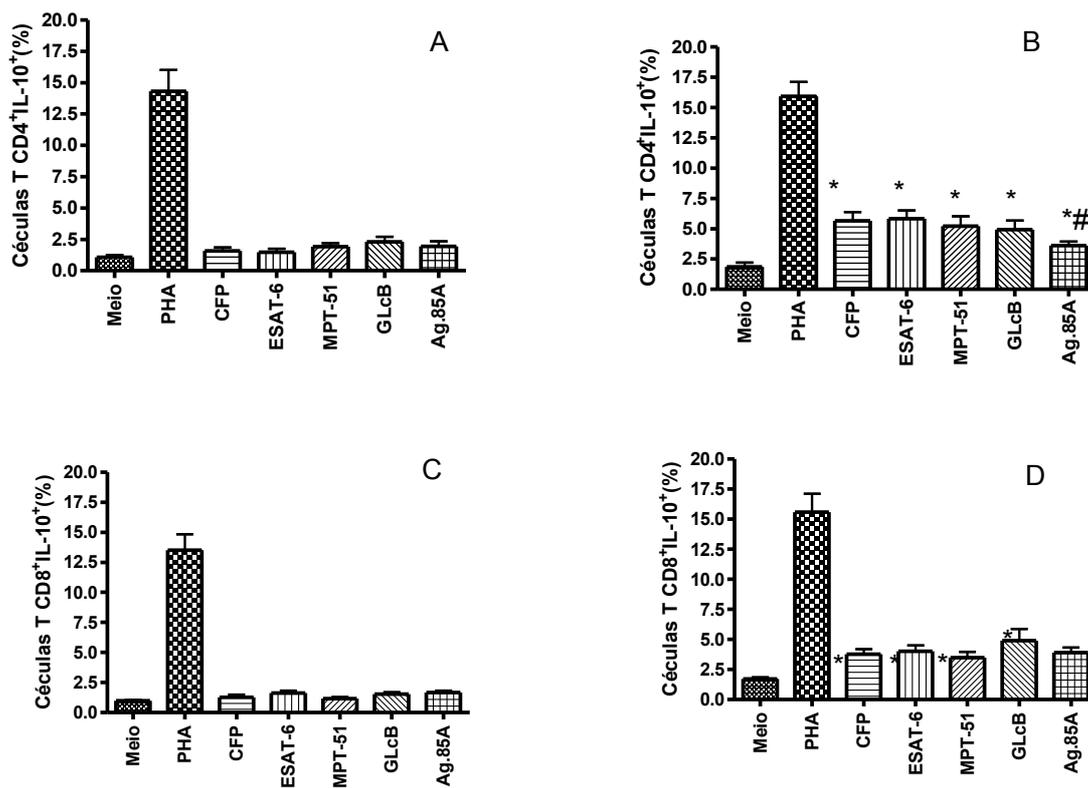


Figura 9. Porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ positivas para IL-10 estimuladas *in vitro* com o mitógeno PHA e os antígenos ESAT-6, MPT-51, GLcB, Ag85A e CFP do *Mycobacterium tuberculosis*. **A.** Porcentagem de células T CD4⁺ positivas para IL-10 de controles saudáveis e **B** de pacientes com tuberculose pulmonar ativa. **C.** Porcentagem de células T CD8⁺IL-10⁺ de controles saudáveis e **D** de pacientes com tuberculose pulmonar ativa. * Diferença significativa entre controle e paciente, $p < 0,01$.

Diferença significativa entre o antígeno 85A e os demais antígenos $p < 0,01$

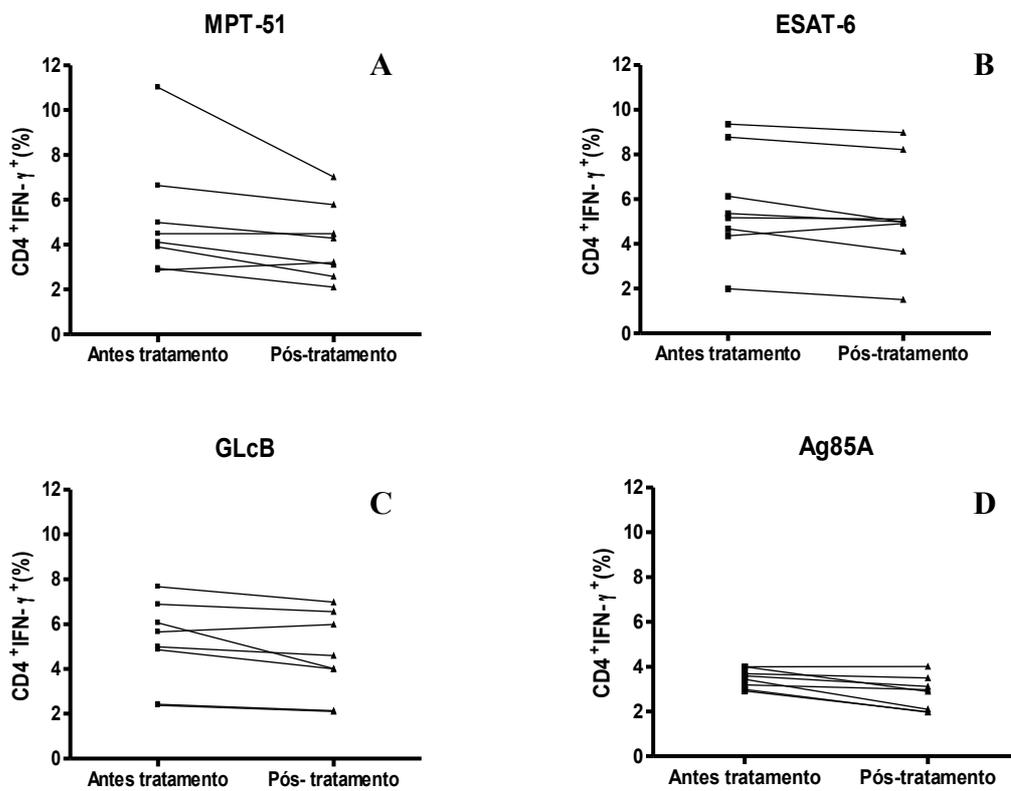


Figura 10. Porcentagem de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa antes e após 15 dias do término do tratamento estimuladas *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51 (A), ESAT-6 (B), GLcB (C) e Ag85A (D) do *Mycobacterium tuberculosis*.

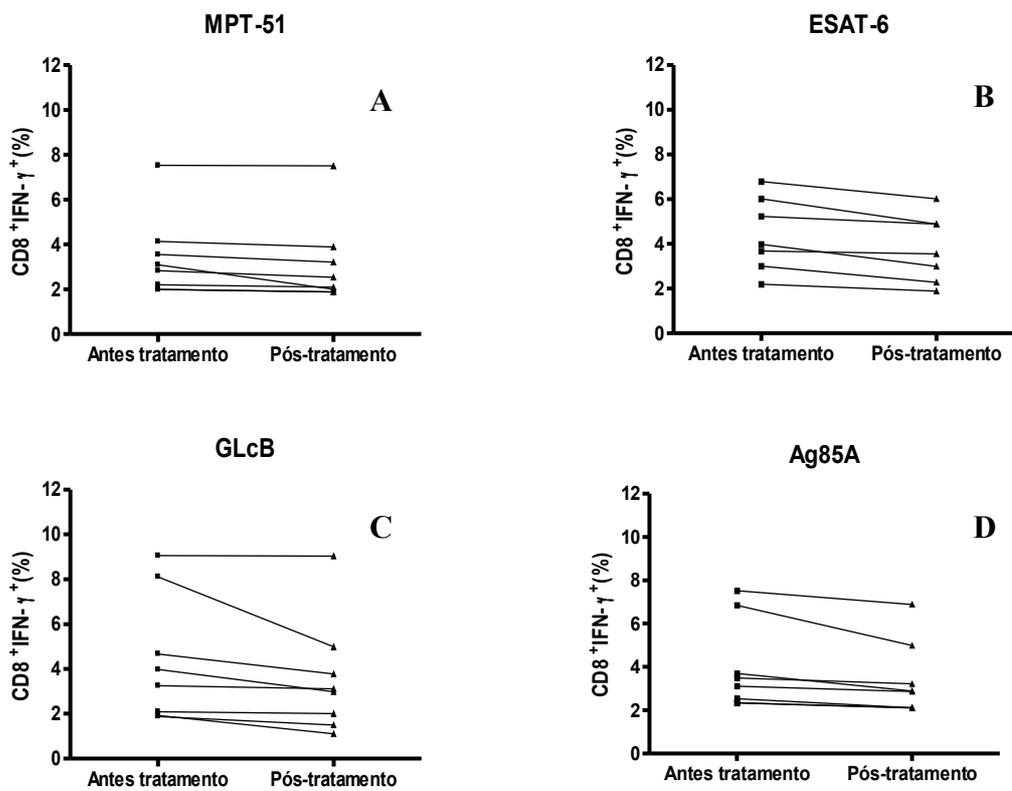


Figura 11. Porcentagem de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa antes e após 15 dias do término do tratamento estimuladas *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51 (A), ESAT-6 (B), GLcB (C) e Ag85A (D) do *Mycobacterium tuberculosis*.

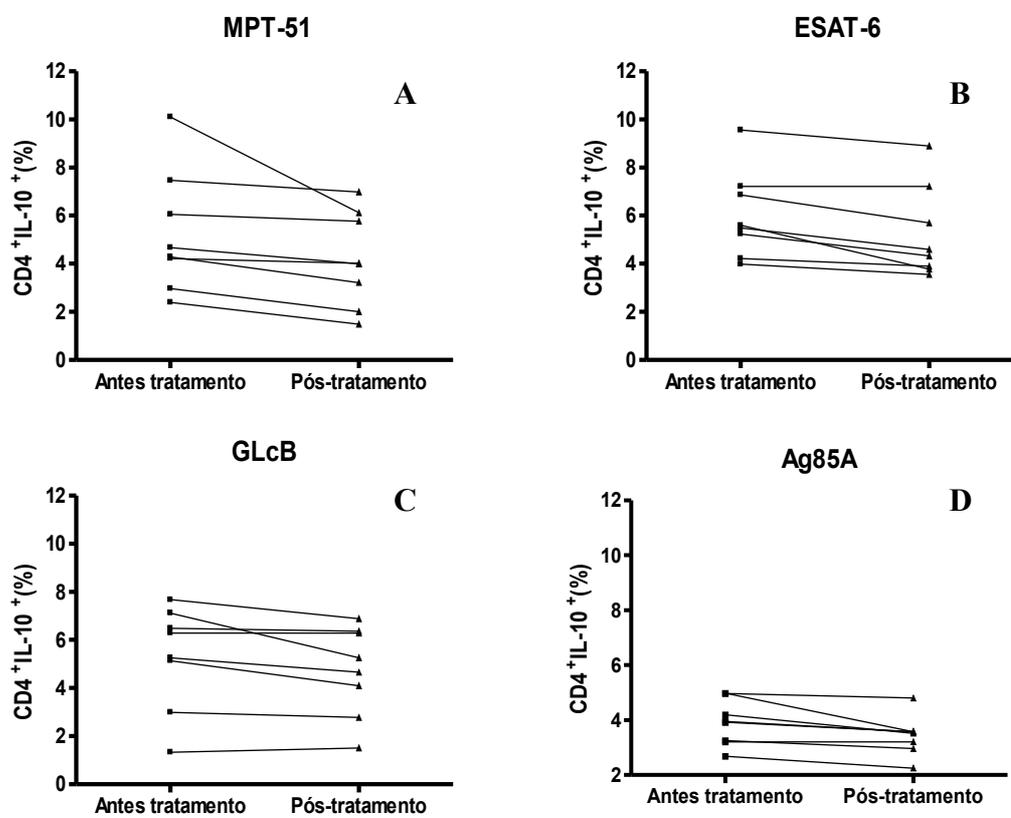


Figura 12. Porcentagem de células T CD4⁺IL-10⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa antes e após 15 dias do término do tratamento estimuladas *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51 (A), ESAT-6 (B), GLcB (C) e Ag85A (D) do *Mycobacterium tuberculosis*.

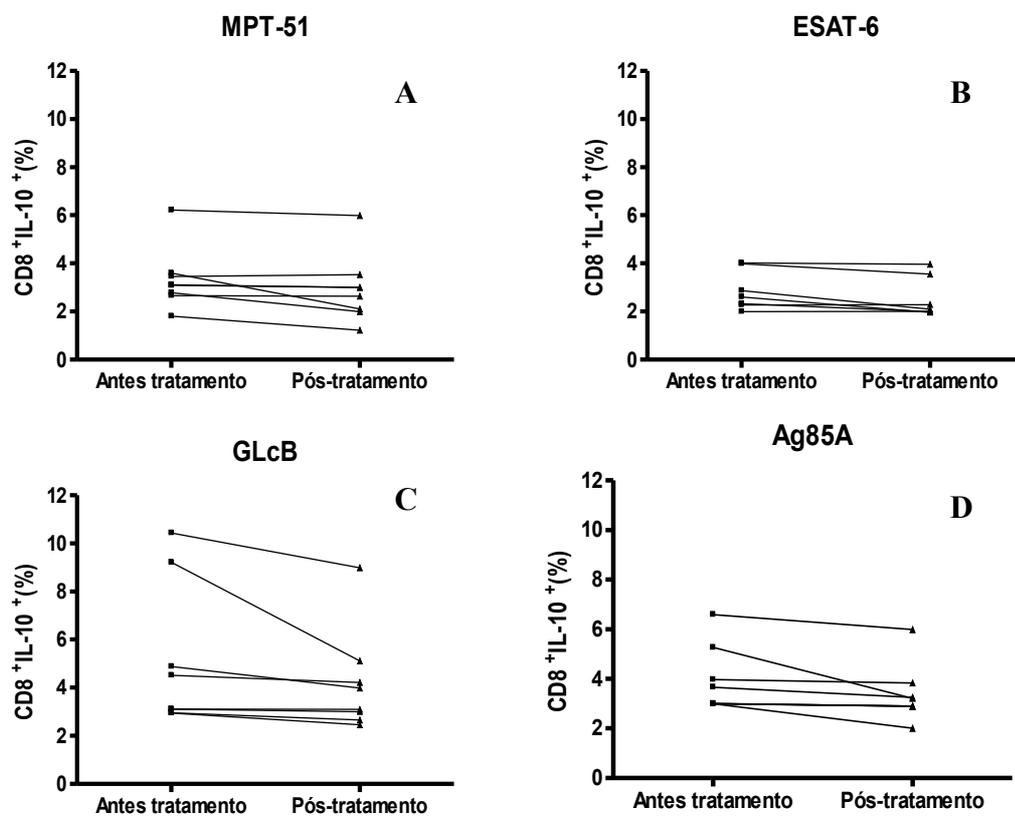


Figura 13. Porcentagem de células T CD8⁺IL-10⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa antes e após 15 dias do término do tratamento estimuladas *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51 (A), ESAT-6 (B), GLcB (C) e Ag85A (D) do *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabela 2: Comparação entre as porcentagens de células CD4⁺IL-10⁺ e CD4⁺IFN- γ ⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes e após o tratamento estimuladas *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag85A do *Mycobacterium tuberculosis*.

	CD4 ⁺ IL-10 ⁺			CD4 ⁺ IFN- γ ⁺		
	Controle	Paciente	Pós-ttm ^a	Controle	Paciente	Pós-ttm ^a
MEIO	1,08±0,53	1,86±1,04	2,15±0,66	1,28±0,50	1,82±0,93	2,09±0,79
PHA	14,32±5,32	15,94±3,69	15,49±2,43	13,60±5,14	15,90±3,39	15,94±2,45
MPT-51	1,92±0,86	5,20±2,64	4,19±1,97	1,76±0,75	5,25±2,47	4,2±1,59
ESAT-6	1,47±0,90	5,83±2,19	5,24±1,90	1,75±0,71	5,63±2,43	5,47±2,28
CFP	1,59±0,86	5,66±2,28	5,07±2,36	1,53±0,81	5,38±2,15	5,0±2,0
GLcB	2,31±1,26	4,92±2,29	4,72±1,87	1,89±0,71	4,72±2,10	4,49±1,75
Ag. 85A	1,95±1,23	3,62±1,04	3,43±0,72	1,60±0,69	3,23±0,75	2,72±0,75

^a Pós-ttm- Pacientes com tuberculose pulmonar com até quinze dias após o tratamento com esquema 1 (Isoniazida- Rifampicina- Pirazinamida).

Tabela 3: Comparação entre as porcentagem de células CD8⁺IL-10⁺ e CD8⁺INF- γ ⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes e após o tratamento estimuladas *in vitro* com os antígenos recombinantes MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag85A do *Mycobacterium tuberculosis*.

	CD8 ⁺ IL-10 ⁺			CD8 ⁺ INF- γ ⁺		
	Controle	Paciente	Pós-ttm ^a	Controle	Paciente	Pós-ttm ^a
MEIO	0,97±0,23	1,72±0,37	2,01±0,17	1,78±0,57	1,65±0,48	1,94±0,24
PHA	13,52±4,24	15,58±4,89	13,81±3,47	13,91±5,05	16,82±5,96	16,62±5,03
MPT-51	1,15±0,42	3,50±1,51	2,93±1,43	1,33±0,61	3,78±2,02	3,11±1,78
ESAT-6	1,62±0,59	4,01±1,48	3,97±1,42	1,49±0,42	4,33±1,45	3,82±1,40
CFP	1,25±0,67	3,78±1,27	3,0±1,48	1,22±0,59	3,46±1,64	2,77±1,49
GLcB	1,53±0,49	4,93±2,89	4,18±2,13	1,58±0,58	4,46±2,70	3,72±2,43
Ag. 85A	1,65±0,48	3,90±1,34	3,37±1,17	1,65±0,66	4,34±1,92	3,58±1,67

^a Pós-ttm- Pacientes com tuberculose pulmonar com até quinze dias após o tratamento com esquema 1 (Isoniazida- Rifampicina- Pirazinamida).

VIII - Discussão

Os antígenos MPT-51, ESAT-6, GLcB, Ag85A e Filtrado Protéico de Cultura (CFP) de *M. tuberculosis* estimularam resposta Th1/Th2, embora o estímulo com Ag 85A tenha sido menor do que os demais. As células TCD4 e CD8 apresentaram maior porcentagem nos pacientes com tuberculose do que nos controles saudáveis. Nos pacientes tuberculosos estas células apresentaram marcação positiva tanto para IFN- γ quanto para IL-10 quando estimuladas pelos antígenos testados.

No grupo dos 22 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (68,19%) e 31,81% era do sexo feminino. Essa observação pode ser atribuída à vida social dos homens nos países em desenvolvimento sendo mais livre e dinâmica do que das mulheres, portanto esse sexo está mais propício à infecção pelo bacilo da tuberculose. Quanto à faixa etária, a idade média dos pacientes com tuberculose foi de 36 anos com variação de 22-63 anos. Dentre 590 pacientes com tuberculose, NOGUEIRA et al. (2001) encontraram uma faixa etária de 30 a 49 anos de idade, o Ministério da Saúde (2006) enfatiza, portanto que ambos os estudos refletem o que ocorre no Brasil e no mundo, embora a população deste estudo foi relativamente menor do que o realizado por NOGUEIRA et al. (2001). No entanto, essas conclusões devem seguir a distribuição geográfica de cada espaço onde se realiza o estudo, tanto no que diz respeito ao sexo e faixa etária da população.

Na avaliação do calendário profilático, notou-se que 19 pessoas com tuberculose pulmonar foram vacinadas com BCG e 3 não souberam informar

sobre a vacinação. Atualmente a eficácia da BCG na proteção contra a tuberculose é muito questionada (FARER, 1986). Apesar da vacina de BCG não oferecer proteção contra a tuberculose pulmonar ativa em adultos, a mesma vacina oferece proteção acima de 50% contra a tuberculose infantil (RODRIGUES et al., 1993; COLDITZ et al., 1994; ICMR, 1999). Essa observação reflete exatamente a faixa etária média de 36,1 anos na população deste estudo, sendo todos adultos e não estando no círculo de proteção oferecida pela vacina de BCG, estando susceptíveis a contaminação pelo bacilo da tuberculose.

Dos tuberculosos, 16 foram positivos para a Prova Tuberculínica (PT) e seis foram PT negativos. Trabalhos mostram que em pacientes em estágio avançado da doença, os linfócitos podem não responder ao estímulo antigênico da PT, podendo resultar em PT negativa. Segundo HARBOE (1981) a PT não é um método de diagnóstico ideal, pois apresenta algumas desvantagens como a necessidade do paciente retornar para efetuação da leitura do teste, bem como a variabilidade e subjetividade na aplicação e leitura do teste. Além disso, a PT tem baixa especificidade, pois os antígenos usados compõem uma mistura de antígenos micobacterianos que estão presentes também em micobactérias não tuberculosas e na cepa de vacina BCG. Apesar dos centros médicos não terem dificuldades em realizar o diagnóstico de pacientes com tuberculose, a PT de fato não pode ser utilizada como único meio de distinguir pacientes sadios de doentes, principalmente em países endêmicos para essa enfermidade como é o caso do Brasil.

A porcentagem dos linfócitos TCD4 e TCD8 IFN- γ e IL10 positivos dos pacientes com tuberculose ativa foram maiores do que os controles saudáveis.

Observou-se ainda, que a porcentagem de células positivas para IL-10 foi parecida com IFN- γ , portanto esses achados podem caracterizar o estado de doença dos pacientes, visto que o IFN- γ tem um papel protetor no controle da tuberculose (KAWAKAMI et al., 2004). Embora o IFN- γ seja produzido por outras células, os linfócitos TCD4 e TCD8 são as principais células secretoras desta citocina. As células TCD4⁺ também são produtoras de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 que já foi identificada em pacientes com tuberculose ativa (GEROSA et al., 1999). Nosso trabalho, não usou marcação específica para células T regulatórias tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ (Treg), mas nossos resultados mostram um aumento preferencial de IL-10 podendo sugerir um papel para estas células no estabelecimento da doença clínica.

Embora não existam trabalhos caracterizando esta resposta em humanos, quando camundongos da linhagem *C57BL/6J-Rag1^{tm1Mom}* (*Rag1^{-/-}*) são infectados com *M. tuberculosis*, a resposta das células CD4 não está correlacionada com o aumento da expressão de citocinas como o IFN- γ ou TNF α ou ainda com a expressão geral de IFN- γ ou da síntese de óxido nítrico nos órgãos infectados. Além disso, a supressão da proteção, não foi acompanhada pelo aumento geral da expressão de IL-10 e nem pelo elevado número da produção de linfócitos TCD4 IL-10⁺ (KURSAR et al. (2007). Esses resultados concordam com muitos estudos já realizados quanto à presença da IL-10 em camundongos experimentalmente infectados com tuberculose (TURNER et al., 2001; ROJAS & BALAJI, 1999; WAAL MALEFYT et al., 1993; FIORENTINO et al., 1991) uma vez que a IL-10 tem sido apontada como uma citocina com atividade imunossupressora, inibindo a proliferação de linfócitos T e a secreção de IFN- γ . Baseado nesse fato, JACOBS et al. (2000); MURRAY & YOUNG

(1999) estudaram a função da IL-10 na susceptibilidade à tuberculose e determinaram as funções antimicobacterianas da IL-10, testando camundongos deficientes para esta citocina e desafiando-os com *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Foi possível observar que os camundongos desafiados tiveram menor carga bacteriana do que os controles. Entretanto, os camundongos IL-10^{-/-} não aumentaram os níveis de IFN- γ , sugerindo que outros mecanismos são responsáveis pelo aumento da resistência.

Em nossa pesquisa, provavelmente houve uma regulação da resposta imune por outras linhagens celulares, sendo necessários futuros estudos para explicar conclusivamente o elevado nível de IL-10 nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

Os antígenos CFP, ESAT-6, MPT-51, GLcB e Ag85A foram capazes de estimular a produção de IFN- γ e IL-10 pelas células T CD4. Entretanto, o Ag85A foi o que menos se destacou quanto à capacidade de estimulação do que os demais estudados. A capacidade das células CD4⁺ em expressar IFN- γ ($5,38 \pm 2,15$) e IL-10 ($5,66 \pm 2,28$), em pacientes com tuberculose pulmonar ativa, quando estimuladas com o Filtrado Protéico de Cultura (CFP) foi elevada. SAMANICH et al. (2000) avaliaram o soro de paciente utilizando como antígeno o CFP por meio de ELISA com o propósito de aplicação de sorodiagnóstico de tuberculose pulmonar. Segundo os resultados encontrados por estes autores, o painel de antígenos do CFP, pode ser aplicado para determinar a existência da doença e para o monitoramento da carga bacteriana na progressão da doença. WELDINGH et al. (1999) identificaram algumas proteínas do CFP como a CFP17, CFP20, CFP21, CFP22, CFP25 e CFP28, como indutoras da produção de IFN- γ em camundongos infectados com *M. tuberculosis* e em pacientes

tuberculosos, entretanto, os autores não descreveram quais células foram secretoras dessa citocina. Esses resultados concretizam os vários questionamentos atuais no sentido de se utilizar mais de um antígeno no estímulo da resposta imune da tuberculose, portanto espera-se assim que o CFP por ter vários antígenos em seu conteúdo, estimulasse mais resposta imune em comparação a um só antígeno, mesmo sendo recombinante como é o caso do MPT-51, ESAT-6, GLcB e Ag 85.

A porcentagem de TCD4 IFN- γ positivas, estimuladas com MPT-51 ($5,25 \pm 2,47$) foi cinco vezes maior nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, que nos controles saudáveis ($1,76 \pm 0,75$). Em trabalho realizado por ACHKAR et al. (2006) identificou-se que o MPT-51 (Rv 3803c) do *M. tuberculosis* é um antígeno imunodominante reconhecido por 80% do soro de pacientes HIV negativos e cultura positiva para tuberculose na Índia. Este trabalho é o primeiro a identificar o reconhecimento do MPT-51 pela resposta imune celular de pacientes com tuberculose. O efeito protetor induzido pela vacinação com rMPT-51 em animais desafiados com *M. tuberculosis*, apesar de não ter superado o induzido pelo *M. bovis* BCG estimulou o aumento dos níveis de IFN- γ sérico (SUZUKI et al 2004). A avaliação da resposta imune ao MPT-51 mostrou que esse antígeno apresenta elevada imunogenicidade por estimular mais a resposta em paciente com tuberculose pulmonar ativa do que nos controles saudáveis.

A avaliação da capacidade do antígeno ESAT-6 em estimular linfócitos TCD4 e CD8 IFN- γ^+ (CD4 $5,63 \pm 2,40$, CD8 $4,33 \pm 1,45$) e IL-10 $^+$ (CD4 $5,83 \pm 2,19$, CD8 $4,01 \pm 1,48$) foi elevada nos nossos resultados. Este trabalho concorda com (LALVANI et al., 2001; CHAPMAN et al., 2001; PATHAN et al., 2001; ELHAY et

al., 1998), onde este antígeno induz a secreção de IFN- γ pelas células TCD4⁺. A imunogenicidade do ESAT-6 tem sido empregada, principalmente para confirmar se a reação a Prova Tuberculínica é devido à elevada exposição ao *M. tuberculosis*, ou a outras espécies de *Mycobacterium* e ainda se a reação é decorrente da vacinação com o BCG, uma vez que esta proteína está ausente na cepa vacinal (HILL et al., 2005; PORÇA et al., 2006). Geralmente, o ESAT-6 é detectado no início da tuberculose pulmonar ativa (VINCENTE et al., 2003). Quando combinado com o CFP-10, a acurácia do ESAT-6 aumenta ainda mais na identificação de indivíduos com tuberculose (TAVARES et al., (2007).

Devido às dificuldades em distinguir a tuberculose ativa da latente, principalmente em países nos quais há elevada exposição ao bacilo da tuberculose, VINCENTI et al. (2003) propuseram avaliar pacientes com tuberculose ativa e observaram que durante esta fase, análises sorológicas de 20 dos 27 pacientes estudados responderam ao ESAT-6 e nenhum dos soros dos controles, incluindo o TB latente, reconheceu peptídeos do antígeno. Os autores concluíram, portanto, que esse antígeno poderá ser usado para diferenciar tuberculose ativa da latente. Então, esse antígeno agrega algumas características importantes para ser aplicado nos estudos em áreas endêmicas, elicitando assim a resposta imune de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e latente, servindo como fonte de informações para os centros de saúde no que diz respeito à identificação de novos casos de tuberculose.

O GLcB foi capaz também de estimular linfócitos TCD4 e TCD8 IFN- γ ⁺ (CD4 4,72 \pm 2,10, CD8 4,46 \pm 2,70) e IL-10⁺ (CD4 4,92 \pm 2,29, CD8 4,93 \pm 2,89) de pacientes com tuberculose pulmonar ativa. SINGH et al. (2005) avaliaram o perfil de antígenos que são reconhecidos por anticorpos de pacientes com

tuberculose subclínica. Dentre esses antígenos, o GLcB foi reconhecido em 90% do soro dos pacientes TB subclínica. Entretanto, o nosso trabalho apresenta caráter inovador quanto ao estudo deste antígeno, pois os pacientes com tuberculose são virgens de tratamento e HIV-, portanto, permite caracterizar a imunogenicidade sem influência de outros fatores, além de ser o primeiro a identificar a resposta imune celular a este antígeno.

Apesar de ENTLEY-HIBBERT et al. (1999) inferirem ao Ag85A, a capacidade de estimular forte resposta imune celular e humoral tanto em humanos quanto em camundongos, a avaliação do Ag85A em estimular os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, no nosso trabalho, demonstrou que esse antígeno não foi tão bem reconhecido pelas células CD4⁺IFN γ ⁺ (3,23 \pm 0,75) e IL10⁺ (3,62 \pm 1,04) quando comparados aos demais antígenos nos pacientes com tuberculose ativa.

Os linfócitos TCD8⁺IFN- γ ⁺ quando estimulados pelos antígenos CFP (3,46 \pm 1,64), ESAT-6 (4,33 \pm 1,45), MPT-51 (3,78 \pm 2,02), GLcB (4,46 \pm 2,70), e Ag85A (4,34 \pm 1,92) estiveram em maior porcentagem, comparados com os controles (CFP 1,22 \pm 0,59, ESTA-6 1,49 \pm 0,42, MPT-51 1,33 \pm 0,61, GLcB 1,58 \pm 0,58, Ag85A 1,65 \pm 0,66), apesar do antígeno 85A ter estimulado menor porcentagem de células que os demais. O linfócito TCD8 apresentou capacidade reduzida de secretar IFN- γ , quando comparados quanto ao TCD4. Esses achados estão de acordo com as observações de NAGAI et al. (2007), pois segundo os autores ambos os padrões de linfócitos (TCD4 e TCD8) são capazes de produzir IFN- γ , na infecção por tuberculose, embora TCD4 responda mais ao estímulo com produção da citocina do que o TCD8. Os autores acrescentaram ainda que durante na infecção micobacteriana, a

resposta do TCD8 com IFN- γ e independente da ativação das células TCD4. Embora ambos os fenótipos de linfócitos sejam importantes na defesa contra a tuberculose, é de se esperar que os TCD8⁺ estimulados pelos antígenos estejam em menor número, apesar de estarem em níveis mais elevados nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, visto que esse padrão de célula está em menor concentração comparada aos TCD4⁺ de controles saudáveis.

A IL-10 é uma interleucina do tipo reguladora que funciona como uma citocina inibidora de macrófagos, células importantes no controle e combate da tuberculose. Por outro lado, as citocinas do tipo Th1, IFN- γ e IL-2, são ativadoras de mecanismos microbicidas dos macrófagos. Dependendo do predomínio do perfil de citocinas, haverá a manifestação da tuberculose ou inibição da progressão da infecção (SILVA & BOECHAT, 2004). Trabalhos realizados por MURRAY et al. (1997) em camundongos que expressavam constitutivamente IL-10, demonstraram que animais que receberam dose subletal de micobactéria morreram, enquanto os do tipo selvagem, que produziam quantidade menor de IL-10, sobreviveram, mostrando que a produção exagerada dessa interleucina diminui as chances de sobreviver à micobactéria. O papel da IL-10 em nosso estudo apresenta-se complexo por envolver padrões de respostas imunes como Th1 e Th2, além disso, deve-se fazer estudos futuros para esclarecer e interligar essas repostas à tuberculose pulmonar ativa.

As avaliações dos fenótipos celulares de linfócitos TCD4 e TCD8 e as citocinas IFN- γ e IL-10, antes e após o tratamento da tuberculose pulmonar não demonstraram diferença. BARCELOS et al. (2006) estudaram as mudanças fenotípicas dos leucócitos antes e após o tratamento de tuberculose pulmonar.

Apesar do estudo ter sido realizado sem estímulo de antígenos recombinantes, os autores observaram que houve um predomínio de TCD4⁺ em comparação com os TCD8⁺ antes do tratamento. Segundo BELKAID et al (2005) o progresso do tratamento, poderá levar a uma diminuição da carga bacteriana e com isso a estimulação antigênica, o que explica a diminuição dos linfócitos TCD4⁺ em resposta ao *M. tuberculosis*. Embora nossos estudos não relatem diferenças significativas no perfil de reconhecimento dos antígenos estudados com relação a presença de células IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺, este é o primeiro trabalho que avalia o fenótipo das células produtoras destas citocinas. Além do mais, os nossos pacientes foram recrutados imediatamente após o término do tratamento, o que pode não ter permitido a redução completa dos antígenos bacterianos, o que manteria os níveis elevados de linfócitos efetores na periferia.

Como houve um equilíbrio entre a resposta imune, Th1/Th2, provocada pelos antígenos estudados, provavelmente outros tipos celulares estão regulando essa resposta. Nesse caso, estudos futuros deverão ser efetuados no sentido de elucidar se as células Treg ou Th17 fazem parte do controle da resposta imune ao *M. tuberculosis*, pois se sabe que possuem participação na resposta imune a tuberculose (IVANOV & LINDÉN, 2007).

Todos esses antígenos provaram ser imunogênicos tanto antes como após o tratamento. Neste estudo, os indivíduos com tuberculose ativa demonstraram serem responsivos aos antígenos do *M. tuberculosis*. Esse aspecto foi evidenciado em um indivíduo que teve regreção da resposta imune após o tratamento, embora todos os demais parâmetros como hemograma, Raio X, cultura e baciloscopia estivessem iguais aos demais indivíduos que não

regrediu a resposta após o tratamento, dentro dos padrões considerados normais para a espécie humana.

IX - Conclusões

Os antígenos recombinantes MPT-51, GlcB, e o Ag.85A, ESAT-6 e as Proteínas do Filtrado de Cultura (CFP) do *M. tuberculosis* são reconhecidos especificamente pela resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

Os antígenos rMPT-51, rGlcB, rAg.85A, rESAT-6 e as Proteínas do Filtrado de Cultura (CFP) foram capazes de induzir a produção de INF- γ por linfócitos TCD4 e TCD8 de pacientes tuberculosos.

Os antígenos rMPT-51, rGlcB, rAg.85A, rESAT-6 e as Proteínas do Filtrado de Cultura (CFP) do *M.tuberculosis* demonstraram ser capazes de estimular células TCD4 e TCD8 positivas para IL-10.

A resposta imune celular aos antígenos testados não foi influenciada pelo tratamento.

A resposta imune celular dos pacientes com tuberculose pulmonar mostrou-se variada com relação a positividade das células TCD4 e TCD8 para IFN- γ e IL-10 em resposta aos antígenos testados.

X- Considerações Finais

Estes resultados confirmam a importância das populações de linfócitos T CD4 e T CD8 na produção de citocinas como IFN-gama e IL-10, mas nossos resultados sugerem a existência de outras populações com funções consideráveis como Th17 e Treg. Portanto, a análise destas populações celulares auxiliará o melhor entendimento da resposta imune envolvida na defesa do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*.

XI - Referências Bibliográficas

1. ABOU-ZEID C, ROOK G, MINNIKIN DE, PARLETT JH, OSBORN TW & GRANGE JM. 1987. Effect of the method of preparation of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine on the properties of four daughter strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 63: 449-453
2. ADEREM A, UNDERHILL DM. 2002. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Review Immunology*; 17: 593-623. 1999.
3. ADLER H, STRAUB, C.; FREI, R. 2005. Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *Europe Journal Clinical Microbiology Infection Disease*; 24: 449-500.
4. ACHKAR JM, DONG Y, HOLZMAN RS, BELISLE J, KOURBETI IS, SHERPA T, CONDOS R, ROM WN, SUMAN L. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* Malate Synthase- and MPT51-Based Serodiagnostic Assay as an Adjunct to Rapid Identification of Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13:1556-1568.
5. ALGOOD HM, LIN PL, FLYNN JL. 2005. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clinical Infection Disease*. 1;41 Suppl 3:S189-93.
6. ANNUNZIATO F, COSMI F, SANTARLASCIO V, MAGGI L, LIOTTA F 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 204:1849-1861.
7. ARDELEANU C, ANDREI F, CEAUSU M, ENE D, MIHAI M, BUTUR G, STANICEANU F, DOBREA C, GALBENU P, VASILESCU F 1999-2004.

Cellular immune response in atypical tuberculosis diagnosed by PCR in paraffin embedded material. Rom Journal Morphological Embryology. 45:63-72.

8. AOSHI T, SUZUKI M, UCHIJIMA M, NAGATA T AND KOIDE Y 2005. Expression mapping using a retroviral vector for CD8+ T cell epitopes: definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-Dd. Journal Immunology Methods; 298: 21-34.
9. BARCELOS W, MARTINS-FILHO OA, GUIMARÃES TMPD, OLIVEIRA M HP, SPINDOLA-DE-MIRANDA S, NASCIMENTO BC, TOLEDO VPCP. 2006. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. Microbiology and Immunology. v. 50, n. 8, p. 597-605.
10. BARNES PF, CHATTERJEE D, ABRAMS JS, LU S, WANG E, YAMAMURA M. 1992. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. Journal Immunology; 149(2): 541-47.
11. BELKAID Y, ROUSE BT. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nature Immunology. 6:353-60.
12. BENENSON A 1997. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Organización Panamericana de la Salud. 16^a ed., Washington:
13. BERGERON A, BONAY M, KAMBOUCHNER M, LECOSSIER D, RIQUET M, SOLER P, HANCE A, TAZI A. 1997. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. Journal Immunology; 159:3034-3043.

14. BERTHET FX, RASMUSSEN PB, ROSENKRANDS I, ANDERSEN P AND GICQUEL B 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*; 144: 3195-3203.
15. BLOOM BR *et al* 1999. New strategies for leprosis and tuberculosis and for development of bacillus Calmette-Guerin into a multivaccine vehicle. *Ann. N. Y. Acad. Sci*; 569: 155-73.
16. BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, HOWARD JC. 1997. Cellular response to interferon- γ , *Annu Review Immunology*; 15:749-795.
17. BONATO VL, LIMA VM, TASCÓN RE, LOWRIE DB, SILVA CL. 1998. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infection Immunology*. 66(1):169-75.
18. BONECINI-ALMEIDA MG, HO JL, BOECHAT N, HUARD RC, CHITALE S, DOO H, GENG J, REGO L, LAZZARINI LC, KRITSKI AL, JOHNSON WD JR, MCCAFFREY TA, SILVA JR. 2004. Down-Modulation of Lung Immune Responses by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Analysis of TGF- β Receptors I and II in Active Tuberculosis. *Infection and Immunity*, p. 2628–2634.
19. BRANDT L, SKEIKY YA, ALDERSON MR, LOBET Y, DALEMANS W, TURNER OC, BASARABA RJ, IZZO AA, LASCO TM, CHAPMAN PL, REED SG, ORME IM. 2004. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infection Immunology*. ;72(11):6622-32.

20. BRENNAN PJ, NIKAIDO H 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Review Biochemical* 64: 29-63.
21. BRODIN P, MAJLESSI L, MARSOLLIER L, DE JONGE MI, BOTTAI D, DEMANGEL C, HINDS J, NEYROLLES O, BUTCHER PD, LECLERC C, COLE ST, BROSCH R. 2006. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infection Immunology* ;74(1):88-98.
22. BROOKS G, BUTEL J, MORSE S 1999. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. (16ª ed.). Mexico: El Manual Moderno.
23. CARDOSO FLL, ANTAS PRZ, MILAGRES AS, GELUK A, FRANKEN KLM C, OLIVEIRA EB, TEIXEIRA HC, NOGUEIRA SA, SARNO EN, KLATSER P, OTTENHOFF THM, SAMPAIO EP. 2002. ESAT-6 in Brazilian Tuberculosis Patients. *Infection and Immunity, Washington*. v.70, n.12, p. 6707–6714.
24. CASARINI M, AMEGLIO F, ALEMANNI L, ZANGRILLI P, MATTIA G, PAONE A, BISETTI A, GIOSUE S 1999. Cytokine levels correlate with a radiologic score in active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 159:143-148.
25. CHAN J. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175: 1111-1122.
26. CHAN J, FAN XD, HUNTER SW, BRENNAN PJ, BLOOM BR 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect and Immunology*. 59(5): 1755-61.

27. CHAN J, KAUFMAN SH. 1994. Immune mechanism of protection. In Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. Bloom B.R. (ed), American Society for Microbiology, USA, p 389-415.
28. CHAPMAN AA, MWANSA B, KATALIN AA, ANSAR AA, KATIE A, HELEN BC, WILLIAM HA, ALWYN B, PETER BC, LALVANI AA. 2002. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells. Basic Science.16:2285-2293.
29. CHATTERJEE D, BOZIC CM, MCNEIL M AND BRENNAN PJ 1991. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal Biological Chem. 266(15): 9652-60.
30. CHATTERJEE D, ROBERTS AD, LOWELL K, BRENNAN PJ & ORME I M. 1992. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. Infection Immunology. 60, 1249-1253.
31. CHRISTENSEN D 2000. Know your enemy. Genetic studies of tuberculosis. Science News ; 158(17): 270-274.
32. CIFONE MG, ULISSE S, SANTONI A. 2001. Natural killer cells and nitric oxide. International Immunopharmacology: 1(8);1513-1524.
33. CIPRIANO IM, MARIANO M, FREYMÜLLER E, CARNEIRO CRW. 2003. Murine Macrophages Cultured with IL-4 Acquire a Phenotype Similar to That of Epithelioid Cells from Granulomatous Inflammation. Inflammation 27(4):201-211.
34. SMITH CV, HUANG CC, MICZAK A, RUSSELL DG, SACCHETTINI JC, BENTRUP KHZ. 2003. Biochemical and Structural Studies of Malate

- Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Biological Chemistry. 278: 1735–1743.
35. COLDITZ GA, BREWER TF, BERKLEY CS, WILSON ME. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis - Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. 271 (9): 698-702.
 36. CONSTANT P, DAVODEAU F, PEYRAT MA, POQUET Y, PUZO G, BONNEVILLE M, FOURNIE JJ. 1994. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*, Vol 264, 267-270.
 37. CORRIGAN CJ, KAY AB. 1992. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunology Today*. Dec; 13(12):501–507.
 38. CRUMP JA, TANNER DC, MIRRETT S, MCKNIGHT CM and RELLER LB. 2003. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 1987-1990.
 39. D'SOUZA S, ROSSEELS V, DENIS O, TANGHE A, DE SMET N, JURION F, PALFLIET K, CASTIGLIONI N, VANONCKELEN A, WHEELER C, HUYGEN K. 2002. Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infection Immunology*. 70(7):3681-8.
 40. DAFÉ M, DRAPER P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microbiology Physiology*; 39:131-203.
 41. DAFÉ M, ETTIENNE G. 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease*; 79(3):153-169.

42. DANNENBERG AM. 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today*; 12: 228.
43. DE BRUYN G AND GARNER P 2003. *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD001166.
44. DIELI F, TROYE-BLOMBERG M, IVANYI J, FOURNIÉ JJ, BONNEVILLE M, PEYRAT MA, SIRECI G, SALEMO A 2000. V γ 9/V δ 2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal Immunology*; 30: 1512-1519.
45. DOHERTY TM, ARDITE M. 2004. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *Journal Clinical Invest.*; 12:1699-1703.
46. DUBOS R & DUBOS J 1996. *The white plague: tuberculosis, man, and society*. Rutgers University Press. New Brunswick; 277pp.
47. DUPUIS S, DOFFINGER R, PICAR C, FIESCHI C, ALTARE F, JOUANGUY E, ABEL L, CASANOVA LJ 2000. Human interferon γ mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion *Immunology Review*; 178:129-137.
48. ELHAY MJ, OETTINGER T, ANDERSEN P. 1998. Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the Guinea Pig. *Infection Immunology*, Vol. 66, No. 7 p. 3454-3456.

49. BENTLEY-HIBBERT SI, QUAN X, NEWMAN T, HUYGEN K, GODFREY HP. 1999. Antigen 85 in Patients with Active Tuberculosis: Antigen 85 Circulates as Complexes with Fibronectin and Immunoglobulin G. *Infection and Immunity*, Vol. 67, No. 4, p. 581-588.
50. ERNEST JD. 1998. Macrophages receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunology*; 66: 12377-12381.
51. FAN XL, YU TH, GAO Q, YAO W. 2006. Immunological properties of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strain expressing fusion protein IL-2-ESAT-6. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* ;38(10):683-90 .
52. FERRAZ JC, STAVROPOULOS E, YANG M, COADE S, ESPITIA C, LOWRIE DB. 2004. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infection Immunology*; 72(12): 6945-50.
53. FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, O'GARRA A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal Immunology*. Dec 1;147(11):3815–3822.
54. FLORCZYK MA, MCCUE LA, STACK RF, HAUER CR And MCDONOUGH KA. 2001. Identification and Characterization of Mycobacterial Proteins Differentially Expressed under Standing and Shaking Culture Conditions, Including Rv2623 from a Novel Class of Putative ATP-Binding Proteins. *American Society for Microbiology*. 69 :5777–5785.

55. FLYNN JL, CHAN J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Review Immunology*; 19: 93-129.
56. FREGUSON JS, SCHELESINGER LS. 2000. Pulmonary surfactant in innate immunity and pathogenesis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*; 80:173-184.
57. GALESÍ VMN. 1999. *Mortalidade por tuberculose no município, análise de uma década, 1986 a 1995*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 112pp.
58. GATELY MK, RENZETTI LM, MAGRAM J, STERN AS, ADORINI L, GUBLER U, PRESKY D. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: Role in normal and pathologic immune response. *Annu Review Immunology*; 16:495-521.
59. GEROSA F, NISII C, RIGHETTI S, MICCIOLO R, MARCHESINI M, CAZZADORI A, TRINCHIERI G 1999. CD41 T Cell Clones Producing both Interferon-g and Interleukin-10 Predominate in Bronchoalveolar Lavages of Active Pulmonary Tuberculosis Patients. *Clinical Immunology*: 92(3): 224-234.
60. GOLDSBY RA, KINDT TJ, OSBORNE BA. 2000. *Kuby Immunology*. 4 ed. New York: W. H. Freeman and Company; 670.
61. GONZALEZ-JUARRERO M, TURNER OC, TURNER J, MARIETTA P, BROOKS JV, ORME IM. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunology* ; 69(3):1722-8.
62. GRANGE J M, *et al* 1993. What is BCG?. *Tubercle*; 64:129-39.

63. HARBOE, M. 1981. Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. Am. Review. Respir. Disease. 124:80-87.
64. HERNANDEZ-PANDO R, JEYANATHAN M, MENGISTU G, AGUILAR D, OROZCO H, HARBOE M, ROOK GA, BJUNE DG 2000. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. Lancet; 356: 2133-2138
65. HETLAND G, WIKER HG, HOGASEN K, HAMASUR B, SVENSON SB & HARBOE M 1998. Involvement of antilipoarabinomannan antibodies in classical complement activation in tuberculosis. Clinical Diagnostic Lab Immunology; 5(2): 211-18.
66. BENTLEY-HIBBERT SI, QUAN X, NEWMAN T, HUYGEN K, GODFREY HP. 1999. Pathophysiology of Antigen 85 in Patients with Active Tuberculosis: Antigen 85 Circulates as Complexes with Fibronectin and Immunoglobulin G. Infection Immunology. 67:581-588.
67. HILL PC, JACKSON-SILLAH D, FOX A, KEES L, FRANKEN MC, LUGOS MD, JEFFRIES DJ, DONKOR SA, HAMMOND AS, ADEGBOLA RA, OTTENHOFF THM, KLEIN MR, BROOKES RH. 2005. ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein and Peptides for Optimal Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Ex Vivo Enzyme-Linked Immunospot Assay in The Gambia. Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.5, p.2070-2074.
68. HMAMA Z, GABATHULER R, JEFFERIES W, JONG G, REINER NE 1998. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular

- sequestration of immature Class II heterodimers. *Journal Immunology*; 162:4882-4893.
69. HOBDAY RA. 1997. Sunlight therapy and solar architecture. *Medical Hist* 41: 455-472.
70. HOTTER GS, WARDS BJ, MOUAT P, BESRA GS, GOMES J, SINGH M, BASSETT S, KAWAKAMI P, WHEELER PR, DE LISLE GW, COLLINS DM. 2005. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. *Journal Bacteriology*; 187(7): 2267-2277.
71. HUEBNER RE 1994. BCG Vaccination the Control of Tuberculosis in: Tuberculosis. Edited by Barry Bloom. American Society for Microbiology, Chapter; 23:263- 279.
72. HUSSAIN R, SHAHID F, ZAFAR S, DOJKI M, DOCKRELL HM. 2004. Immune Profiling of Leprosy and Tuberculosis Patients to 15-men Peptides of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* GroES in a BCG Vaccinated Area: Implications for Development of Vaccine and Diagnostic Reagents. *Immunology*. 111: 462-471.
73. HUYGEN K. 1998. DNA vaccines: application to tuberculosis. *Int Journal Tuberculosis Lung Disease*; 2(12): 971-78.
74. ICMR. 1999. Priorities for research tuberculosis: report of an ICMR meeting. *The Indian Journal of Tuberculosis*. v.46, n.3, p. 204-209.

75. JAMES BW, WILLIAMS A, MASH PD. 2000. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *Journal Appl Microbiology*; 88:669-677.
76. JOHANSEN P, RAYNAUD L, YANG M, COLSTON MJ, TASCAN RE, LOWRIE DB. 2003. Anti-Mycobacterium immunity induced by a single injection of *M. leprae* Hsp65-encoding plasmid DNA in biodegradable microparticles. *Immunology Lett*; 90(2-3):81-85.
77. JOKLIK W, WILLETT H, AMOS B, WILFERT C. 1994. *Zinzer. Microbiological*. (20a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
78. JOUANGUY E, DOFFINGER R, DUPUIS S, PALLIER ALTARE F, CASANOVA LJ 1999. IL-12 and IFN- γ host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Op Immunology*; 11:346-351.
79. JUNQUEIRA-KIPNIS AP, KIPNIS A, JAMIESON A, JUARRERO MG, DIEFENBACH A, RAULET DH, TURNER J, ORME IM. 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *Journal Immunology*. 1;171(11):6039-45.
80. KAUFMANN SHE. 2004. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Disease*; 63:50-56.
81. KEANE J, KATARZYNA M, BALCEWICZ S, REMOLD H. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophages apoptosis. *Infection Immunology*; 298:298-304.
82. KNOWELS MR, BOUCHER RC 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airway. *Journal Clinical Invest*; 109:571-577.

83. KONOMI N, LEBWOHL E, MOWBRAY K, TATTERSALL I, ZHANG D. 2002. Detection of Mycobacterial DNA in Andean Mummies. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 40, N.12, p. 4738-4740.
84. KURSAR, M.; KOCH, M.; MITTRÜCKER, H.W.; NOUAILLES, G.; BONHAGEN, K.; KAMRADT, T.; KAUFMANN, S.H.E. 2007. Regulatory T Cells Prevent Efficient Clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, v.178, p.2661-2665.
85. LALVANI, A.; PATHAN, A.A. 2001. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Enumeration of Antigen-specific T Cells. *Am Journal Respir Crit Care Med*, 163:824-8.
86. LI B, ROSSMAN MD, IMIR T, ONER-EYUBOGLU F, LEE CHW, BIANCANIELLO R, CARDING SR 1996. Disease-specific changes in $\gamma\delta$ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal Immunology*; 157:4222-4229.
87. LI Y, BAO L, ZHANG HD, LI YS & ZHU HL. 2006. Construction of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing ESAT-6 and its effects on macrophages. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* ;26(7):923-6.
88. LI. B, BASSIRI H, ROSSMAN MD, KRAMER P, ONER EYUBOGLU F, TORRES M, SADA E, IMIR T, CARDING SR 1998. Involvement of the Fas/Fas Ligand pathway in activation-induced cell death of Mycobacteria-reactive human $\gamma\delta$ T cells: A mechanism for the loss of $\gamma\delta$ T cell in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal Immunology*; 161:1558-1567.
89. LIN Y, ZHANG M, HOFMAN FM, GONG J, BARNES PF 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immunology*; 64:1351-1356.

90. LAAL SKM, SAMANICH MG, SONNENBERG S, ZOLLA-PAZNER JM, PHADTARE BJT. 1997. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. *Clinical Diagnostic. Lab. Immunology*. 4:49–56.
91. LOWRIE DB 2003. DNA vaccination: an update. *Methods Mol Med*; 87: 377-90.
92. LOWRIE DB AND SILVA CL 2000. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine* 18(16): 1712-16.
93. LOWRIE DB, TASCO RE, COLSTON MJ, SIILVA CL. 1994. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine*;12(16):1537-40. Review.
94. LOWRIE DB, TASCAN RE, BONATO VL, LIMA VM, FACCIOLI LH, STAVROPOULOS E, COLSTON MJ, HEWINSON RG, MOELLING K, SILVA CL. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 15;400(6741):269-71.
95. MCSHANE H, BROOKES R, GILBERT SC AND HILL AV 2001. Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immunology*; 69: 681-86.
96. MCSHANE H, PATHAN AA, SANDER CR, KEATING SM, GILBERT SC, HUYGEN K 2004. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boost BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat med*; 10(11): 1240-44.
97. MADEGAN B, PARKER M. 1994. *Biology of Microorganisms*, 7^a ed. Englewoods Cliffs, Prentice Hall.

98. MAHAIRAS GG, SBO PJ, HICKEY MJ, SINGH DC AND STOVER CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*; 178: 1274-1282.
99. MAHESHWARI A, HAN S, MAHATO RI and KIM SW. 2002. Biodegradable polymer-based interleukin-12 gene delivery: role of induced cytokines, tumor infiltrating cells and nitric oxide in anti-tumor activity. *Gene Therapy* 9: 1075–1084.
100. MALDONADO J. 1999. (Editor) La tuberculosis vuelve a ser un grave problema de salud. *Iladiba* [On line] Disponible en: <http://www.iladiba.com>. 1999b.
101. MANDELL G, BENNETT J, DOLIN R, 1995. Principles and practice of infectious diseases. 4^a ed. New York Churchill Livingstone. Vol II.
102. MANFREDI A, HEALTAI S, ROVERA P, ROVERE P, SCIORATI C, PAOLUCCI C, GALATI G, RUGARLI C, VAIANI R, CLEMENTI E, FERRARINI M 1998. *Mycobacterium tuberculosis* exploits the CD95/CD95 ligand system of $\gamma\delta$ T cell to cause apoptosis. *Europe Journal Immunology*; 28:1798-1806.
103. MARTIN C, 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Europe Respir Journal*; 26(1):162-7.
104. MCNEIL M, DAFTE M AND BRENNAN PJ 1990. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cells walls. *Journal Biol Chem*; 265:18200-18206.
105. MICHAEL G. SONNENBERG AND JOHN T. B. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Proteins by Two-Dimensional

- Polyacrylamide Gel Electrophoresis, N-Terminal Amino Acid Sequencing, and Electrospray Mass Spectrometry INFECTION AND IMMUNITY. 65: 4515–4524.
106. MIKI, K.; NAGATA, T.; TANAKA, T.; KIM, Y.H.; UCHIJIMA, M.; OHARA, N.; NAKAMURA, S.; OKADA, M.; KOIDE, Y. 2004. Induction of Protective Cellular Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by Recombinant Attenuated Self-Destructing *Listeria monocytogenes* Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPT51. Infection and Immunity. 72: 2014-2021.
107. MIKUSOVA K, YAGI T, STERN R, MCNEIL MR, BESRA GS, CRICK DC AND BRENNAN PJ 2000. Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall. Journal Biol Chem; 275: 33890-33897.
108. MOHAGHEGHPOUR N, GAMMON D, KAWAMURA LM, VAN VOLLENHOVEN A, BENIKE CJ, ENGLEMAN EG. 1998. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. Journal Immunology. 161:2400–2406.
109. MOLLENKOPF HJ, GROINE-TRIEBKORN D, ANDERSEN P, HESS J AND KAUFMANN SH 2001. Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. Vaccine; 19(28-29): 4028-35.
110. MONTEIRO CA. 1995. *Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças*. Ed. Hucitec e NUPENS/USP, São Paulo; 356pp.
111. MOSMANN TR & SAD S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets, Th1, Th2 and more. Immunology Today, 17, 138-146.

- 112.MURRAY PJ, YOUNG RA. 1999. Increased Antimycobacterial Immunity in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infection and Immunity*.67: 3087-3095.
- 113.MURRAY HW, SPITALNY GL & NATHAN CF 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *Juornal Immunology*. 134: 1619-1622.
- 114.NAGAI P, MCCORMICK S, SMALL C, ZHANG X, ZGANIACZ A, AOKI N, XING Z. 2007. Gamma interferon responses of CD4 and CD8 T-cell subsets are quantitatively different and independent of each other during pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Infect Immunology*.75: 2244-52.
- 115.NAGAI S, WIKER HG, HARBOE M AND KINOMOTO M 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunology*; 59: 372-382.
- 116.KONOMI N, LEBWOHL E, MOWBRAY K, TATTERSALL I, ZHANG D. 2002. Detection of Mycobacterial DNA in Andean Mummies. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 4738–4740.
- 117.NEWPORT MJ, HUXLEY CM, HUSTON S, HAWRYLOWICZ CM, OOSTRA BA, WILLIAMSON R.; LEVIN, M. 1996. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl Journal Med* 335:1941–1949.
- 118.NICHOLSON S, BONECINI-ALMEIDA G, LAPA JR, NATHAN C, XIE Q, MUMFORD R, WEIDNER JR, CALAYCAY J, GEN J, BOECHAT N, LINHARES C, ROM W, HO J.L 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Juornal Exp Med* ; 183:2293-2302.

119. NOGUEIRA PA, MALUCELLI MIC, ABRAHÃO RMCM, ALMEIDA MMB. 2001. Avaliação das informações de tuberculose 1989 – 1999 de um Centro de Saúde Escola da cidade de São Paulo. Review. Bras. Epidemiol. 4: 131-139.
120. OHARA N, NISHIYAMA T, OHARA-WADA N, MATSUMOTO S, MATSUO T AND YAMADA T. 1997. Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85 C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. Microbiology Pathog; 23: 303-310 (a).
121. OHARA N, OHARA-WADA N, KITaura H, NISHIYAMA T, MATSUMOTO S AND YAMADA T 1997. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. Infection Immunology; 65: 3680-3685 (b).
122. OLAKANMI O, BRITIGAN BE, SCHLESINGER LS 2000. Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. Infection Immunology ; 68: 5619-5627.
123. ORDWAY DJ, COSTA L, MARTINS M, SILVEIRA H, AMARAL L, ARROZ MJ, VENTURA FA, DOCKRELL HM. 2004. Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. J Infection Disease. 15;190(4):756-66.
124. ORDWAY DJ, PINTO L, COSTA L, MARTINS M, LEANDRO C, VIVEIROS M, AMARAL L, ARROZ MJ, VENTURA FA, DOCKRELL HM. 2005. Gamma delta T cell responses associated with the development of

- tuberculosis in health care workers. FEMS Immunology Medical Microbiology, 1;43(3):339-50.
- 125.ORDWAY DJ, MARTINS MS, COSTA LM, FREIRE MS, ARROZ MJ, DOCKRELL HM, VENTURA FA. 2005. Aumento da produção de IL-4 Resposta ao *Mycobacterium tuberculosis* virulento em doentes com tuberculose em estágio avançado. Acta Med Port,18: 27-36.
- 126.ORME I 2004. Adaptative immunity to mycobacteria. Curr Op Microbiol; 7:58-61.
- 127.ORME IA, COOPER AMM. 1999. Cytokines/chemokines cascades in immunity to tuberculosis. Immunology today; 20:307-312.
- 128.PADUNGCHAN S, KONJANART S, KASIRATTA S, DARAMAS S, TEN DAM HG. The effectiveness of BCG vaccination of the newborn against childhood tuberculosis in Bangkok. Bull World Health Organ 1986;64:247-58.
- 129.PATHAN AA, WILKINSON KAA, KLENERMAN P, MCSHANE H, DAVIDSON RN, PASVOL G, HILL AVS, LALVANI A. 2001. Direct Ex Vivo Analysis of Antigen-Specific IFN- γ -Secreting CD4 T Cells in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Individuals: Associations with Clinical Disease State and Effect of Treatment. The Journal of Immunology.167: 5217-5225.
- 130.PAUL E, FINE M 2001. BCG: The Challenge Continues. Scand Journal Infect Disease; 33: 243-245.
- 131.PINTO R, SAUNDERS BM, CAMACHO LR, BRITTON WJ, GICQUEL B AND TRICCAS JA. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective

- immunity against tuberculosis than the existing bacilli Calmette-Guerin vaccine. *Journal Infect Disease*; 189(1): 105-2. Epub 2003 Dec 22.
- 132.PORCELLI A, MORITA CT, BRENNER MB. 1992. CD1b restricts the response of human CD4-8-T lymphocytes to microbial antigen. *Nature*. 360: 593-597.
- 133.PORSA E, CHENG L, SEALE MM, DELCLOS GL, XIN MA, REICH R, MUSSER JM, GRAVISS EA. 2006. Comparison of a New ESAT-6/CFP-10 Peptide-Based Gamma Interferon Assay and a Tuberculin Skin Test for Tuberculosis Screening in a Moderate-Risk Population. *Clinical and Vaccine Immunology*.13: 53-58.
- 134.QUESNIAUX V, FREMOND C, JACOBS M, PARIDA S, NICOLLE D, YEREMEEV V, BIHL F, ERARD F, BOTHA T, DRENNAN M. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infection* 6, 946-959.
- 135.RAJA A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian Journal Med Res*; 120:213-23.
- 136.RAMBUKKANA A, DAS PK, KOLK AH, BURGGRAAF JD, KUIJPER S AND HARBOE M 1993. Identification of a novel 27 kDa protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture fluid by monoclonal antibody specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Scand Journal Immunology*; 37: 4714-478.

137. RIGANO MM, DREITZ S, KIPNIS AP, IZZO AA, WALMSLEY AM. 2006. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. *Vaccine* 24: 691–695.
138. RINKE DE WIT TF, BEKELIE S, OSLAND A, WIELES B, JANSON AA AND THOLE JE 1993. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C and related and MPT51 proteins. *Infection Immunology*; 61: 3642-3647
139. ROBERTS GD. 1991. *Manual of clinical microbiology*. Mycobacterium. Washington DC. Book; 304-39.
140. ROBERTS AD, SONNENBERG MG, ORDWAY DJ, FURNEY SK, BRENNAN PJ, BELISLE JT, and ORME IM. 1995. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 85:502–508.
141. RODRIGUES LC, DIWAN VK, WHEELER JG. 1993. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analyse. *International Journal Epidemiological*. 22(6): p. 1154-68.
142. ROJAS RE, BALAJI KN, SUBRAMANIAN A, BOOM WH. 1999. Regulation of Human CD4+ alpha beta T-Cell-Receptor-Positive (TCR+) and gamma delta TCR+ T-Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis* by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor beta. *Infect Immunology*. 67: 6461-6472.
143. ROMANUS V. 1987. Tuberculosis in Bacillus Calmette-Guerin-immunized and unimmunized children in Sweden: a ten-year evaluation following the

- cessation of general Bacillus Calmette-Guerin immunization of the newborn in 1975. *Pediatr Infect Dis*; 6:272-80.
- 144.ROSAT JP, GRANT EP, BECKMAN E. 1999. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8ab T cell pool. *Journal Immunology*: 162:366-373.
- 145.RUSSELL AD. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal Hosp. Infection*. 43: (Suppl.):S57-S68.
- 146.SABLE SB, GOYAL D, VERMA I, BEHERA D, KHULLER GK. 2007. Lung and blood mononuclear cell responses of tuberculosis patients to mycobacterial proteins. *Europe Respir Journal* ; 29(2):337-46.
- 147.SADEK M, SADA E, TOOSI Z, SCHWANDER S, RICH E 1998. Chemokines induced by infections of mononuclear phagocytes with Mycobacteria and present in lung Alveoli during active pulmonary tuberculosis, *Am Respir Cell Mol Biol*; 19:513-521.
- 148.SAMANICH KM, KEEN MA, VISSA VD, HARDER JD, SPENCER JS, BELISLE JT, ZOLLA-PAZNER S, LAAL S. 2000. Sorodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 7, No. 4, p. 662–668.
- 149.SANO K, HANDEA K, TAMURA G, SHIRATO K. 1999. Ovalbumin (OVA) AND *Mycobacterium tuberculosis* bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper cells toward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. *Am Journal Resp Cell Mol Biol*, v.20, p.1260-1267.

- 150.SAUNDERS BM, FRANK AA, ORME IM AND COOPER AM. 2002. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol*; 216 (1-2): 65-72.
- 151.SCHLUGER NW 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res*; 2:157-163.
- 152.SCIORATC, ROVERE P, FERRARINI M, PAOLUCCI C, HELTAI S, VAIANI R, CLEMENTI S, MANFREDI AA. 1999. Generation of Nitric Oxide by the Inducible Nitric Oxide Synthase Protects $\gamma\delta$ T Cells from *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Apoptosis. *The Journal of Immunology*.163:1570-1576.
153. SCOTT-BROWNE JP, SHAFIANI S, TUCKER-HEARD G 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 204:2159-2169.
- 154.SEIBERT FB, MUNDAY B. The chemical composition of the active principle of tuberculosis. XV. A precipitated purified tuberculin protein suitable for the preparation of a standard tuberculin. *Amer Rev Tuberc* 1932;25:724.
- 155.SHIMAO T. 2003. Mortality rate of pulmonary TB in the late 19th century. *Kekkaku*. Oct; 78(10):633-6.
- 156.SHIMAO T. (2005) Tuberculosis and its control--lessons from the past and future prospect. *Kekkaku*. Jun; 80(6):481-9.
- 157.SIBLEY LD, HUNTER SW, BRENNAN PJ & KRAHENBUHL JL 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun*; 56(5): 1232-36.

- 158.SILVA JRL, BOÉCHAT N. 2004. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 30: 4.
- 159.SILVA CL, BONATO VL, LIMA VM, FACCIOLI LH, LEAO SC. 1999. Characterization of the memory/activated T cells that mediate the long-lived host response against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin or DNA vaccination. *Immunology*. 97(4):573-81.
- 160.SILVA CL, SILVA MF, PIETRO RC, LOWRIE DB. 1996. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infection Immunology*. 64(7):2400-7.
- 161.SINGH KK, DONG Y, BELISLE JT, HARDER J, ARORA VK, LAAL S. 2006. Antigenes of *Mycobacterium tuberculosis* Recognized by Antibodies during Incipient, Subclinical Tuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12: 354–358.
- 162.SINGH KK, DONG Y, BELISLE JT, HARDER J, ARORA VK AND LAAL S. 2005. Antigenes of *Mycobacterium tuberculosis* recognized by antibody during incipient, subclinical tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*; 12: 354-358.
- 163.SKEIKY YA, ALDERSON MR, OVENDALE PJ, GUDERIAN JA, BRANDT L, DILLON DC, CAMPOS-NETO A, LOBET Y, DALEMANS W, ORME IM, REED SG. 2004. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *Journal Immunol*. 15;172(12):7618-28.

164. SMITH PG. Case-control studies of the efficacy of BCG against tuberculosis. In: International Union Against Tuberculosis, ed. Proceedings of the XXVIth IUAT World Conference on Tuberculosis and Respiratory Diseases. Singapore: Professional Postgraduate Services International, 1987:73-9.
165. SODHI A, GONG J, SILVA C, QUIAN D, BARNES P 1997. Clinical correlates of interferon- γ production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis*; 25:617-620.
166. SONNENBERG MG, BELISLE JT. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Proteins by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis, N-Terminal Amino Acid Sequencing, and Electrospray Mass Spectrometry. *Infection and Immunity*, Vol. 65, No. 11, p. 4515–4524.
167. SORENSEN AL, NAGAI S, HOUEN G, ANDERSEN P, ANDERSEN AB 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunology*; 63: 1710-1717.
168. STENGER S, MODLIN RL. 1999. Cytotoxic T-Cell Responses to Intracellular Pathogens. *Cytotoxic Cells: Basic Mechanisms and Medical Applications*, edited by Sitkovsky MV, Henkart PA. Lippincott Williams & Wilkins, 269-279.
169. STENGER S, HANSON DA, TEITELBAUM R, DEWAN P, NIAZI KR, FROELICH CJ, GANZ T, USZYNSKY S, MELIÁN A, BODGAN C, PORCELLI A, BLOOM BR, KRENSKY AM, MODLIN RL 1998. An

- antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*; 282:121-125.
170. STUGILL-KOSZYCKI S, SCHLESINGER PH, CHAKRABORTY P, HADDIX PL, COLLINS HL, FOK AK, ALLEN RD, GLUCK SL, HEUSER J, RUSSEL DG 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*; 263:678-681.
171. SUNG N, TAKAYAMA K, COLLINS M T. 2004. Possible Association of GroES and Antigen 85 Proteins with Heat Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1688–1697.
172. SUZUKI M, AOSHI T, NAGATA T, KOIDE Y. 2004. Identification of murine H2-Dd- and H2-Ab-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunology*. 72: 3829-3837.
173. TAHA RA, KOTSIMBOS TC, SONG YL, HAMID Q 1997. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am Journal Respir Crit Care Med*; 155: 1135-1139.
174. TAN JS, CANADAY DH, BOOM WH, BALAJI KN, SCHWANDER SK, RICH EA 2000. Human alveolar T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T Cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *Journal Immunology*; 159:290-297.

175. TIDJANI O, AMEDOME A, TEN DAM HG. The protective effect of BCG vaccination of the newborn against childhood tuberculosis in an African community. *Tubercle* 1986;67:269-81.
176. TORRES M, HERRERA T, VILLAREAL H, RICH E, SADA E 1998. 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*. *Infection Immunology*; 66:176-180.
177. TRINCHIERI G. 1995. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunology*; 13:251-276.
178. TRIPATHY SP. Fifteen-year follow-up of the Indian BCG prevention trial. In: International Union Against Tuberculosis, ed. *Proceedings of the XXVIth IUAT World Conference on Tuberculosis and Respiratory Diseases*. Singapore: Professional Postgraduate Services International, 1987: 69-72.
179. TSAI MC, CHAKRAVARTY S, ZHU G, XU J, TANAKA K, KOCH C, TUFARIELLO J, FLYNN J, CHAN J 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular Microbiology* 8 (2), 218–232.
180. TURNER T, GONZALEZ-JUARRERO M, ELLIS DL, BASARABA RJ, KIPNIS A, ORME IM, COOPER AM. 2002. In Vivo IL-10 Production Reactivates Chronic Pulmonary Tuberculosis in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology*. v.169, p. 6343–6351.

- 181.ULRICH T, FAUFMANN SHE 2002. Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci*; 7:458-469.
- 182.UNDERHILL DM, OZINSKY A, SMITH KD, ADEREM A. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *PNAS* v.96, n. 25, p.14459–14463.
- 183.VINCENTI D, CARRARA S, MORI P, PUCILLO LP, PETROSILLO N, PALMIERI F, ARMIGNACCO O, IPPOLITO G, GIRARDI E, AMICOSANTE M, GOLETTI D. 2002. Identification of Early Secretory Antigen Target-6 Epitopes for the Immunodiagnosis of Active Tuberculosis. *Molecular Medicine*. v.9, n.3.
- 184.USAID, 2006. From de American People – Tuberculosis profile for Brazil. Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*; 15:294-309.
- 185.VORDERMEIER HM, HUYGEN K, SINGH M, HEWINSON RG & XING Z. 2006 Immune responses induced in cattle by vaccination with a recombinant adenovirus expressing Mycobacterial antigen 85A and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection Immunology*. ; 74(2):1416-8.
- 186.WANG Y, CURRY HM, ZWILLING BS, LAFUSE WP 2005. Mycobacteria Inhibition of IFN- γ Induced HLA-DR Gene Expression by Up-Regulating Histone Deacetylation at the Promoter Region in Human THP-1 Monocytic Cells. *Journal Immunology*; 9:5687-5694.
- 187.WANGO A, JOHNSON L, GOUGH J, ACKBAR R, INGLUT S, HICKS D, SPENCER Y, HEWINSON G, VORDERMEIER M 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta

- (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*; 133(4):223-234.
188. BARCELOS W, MARTINS-FILHO OA, GUIMARÃES TMP, OLIVEIRA MHP, SPÍNDOLA-DE-MIRANDA S, CARVALHO BN, TOLEDO VPCP. 2006. Peripheral Blood Mononuclear Cells Immunophenotyping in Pulmonary Tuberculosis Patients before and after Treatment. *Microbiology and Immunology*. 50: 597-605
189. WELDINGH K, ROSENKRANDS I, JACOBSEN S, RASMUSSEN PB, ELHAY MJ, ANDERSEN P. 1999. Two-Dimensional Electrophoresis for Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate and Purification and Characterization of Six Novel Proteins. *Infection and Immunity*. Vol. 66, No. 8, p. 3492–3500.
190. World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No. 3. Geneva: World Health Organization; 2004. Available from: URL: www.who.int/gtb/publications/drugresistance/2004/drs_report_1.pdf
191. World Health Organization 2006. Tuberculosis Facts.
192. WICKREMÁSINGHER MI, LYNETTE HT, FRIEDLAND JS 1999. Pulmonary epithelial cells are source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF κ B dependent network. *Journal Immunology*; 163: 3936-3947.
193. WILSON RA, MAUGHAN WN, KREMER L, BESRA GS AND FUTTERER K 2004. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *Journal Mol Biology*; 335: 519-530.

194. WILSON RA, RAI S, MAUGHAN WN, KREMER L, KARIUKI BM, HARRIS KD, WAGNER T, KITaura H, OHARA N, NAITO M, KOBAYASHI K AND YAMADA T 2000. Fibronectin-binding protein secreted by *Mycobacterium avium*. *Apmis*; 108: 558-564.
195. DE WAAL MALEFYT R, FIGDOR C G and DE VRIES JE. 1993. Effects of interleukin 4 on monocyte functions: comparison to interleukin 13. *Response Immunology*. 144:629-633.
196. XING Z, SANTOSUOSSO M. 2000. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *Journal Leukoc Biology*. 68: 897-902.
197. ZHANG M, GATELY MK, WANG E, GONG J, WOLF SF, LU S, MODLIN RL, BARNES PF 1994. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *Journal Clinical Investig*; 93:1733-1739.
198. ZHANG M, GONG J, PRESKY DH, XUE W, BARNES PF 1999. Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *Journal Immunology*; 162:2441-2447.
199. ZINK AR, SOLA C, REISCHL U, GRABNER W, RASTOGI N, WOLF H, NERLICH AG. 2002. Molecular identification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex in ancient Egyptian mummies. *International Journal of Osteoarchaeology*. 14: 404-413.

XII – Anexos

1- Termo de Consentimento dos Voluntários

1.1 Controles Saudáveis

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia – GO.CEP 74605-050

Fone (062)3521.1837 – 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

Consentimento de Participação na pesquisa

Título do projeto: **Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos.**

Nome do pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, DVM, Ph.D.

Contato para problemas e dúvidas decorrentes desta pesquisa: Dr. João Alves de Araújo Filho, Médico, telefone: 62 3225-4971.

Você está sendo convidado a participar, voluntariamente, em uma pesquisa que será conduzida na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-Goiás). Esta pesquisa tentará identificar proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença tuberculose) que são reconhecidas pelo sangue (soro e células) de pessoas saudáveis e pacientes com tuberculose.¹

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para: a) explicar o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. b) o seu sangue será coletado (20 mL). Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que haja qualquer prejuízo (Goiânia, Goiás, Brasil).

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Para coletar o seu sangue, o seu braço será limpo e esterilizado com álcool, depois de garrotear a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringas estéreis. Para a coleta, será usada uma seringa de 20 mL. Não é possível identificar todos os problemas que podem ocorrer durante esse procedimento, mas nós (médico, enfermeira e o pesquisador) tomamos todas as medidas para minimizar os riscos desconhecidos desse procedimento.

Os resultados sobre a sua saúde e dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pela pesquisadora responsável. Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados numa revista científica internacional.

Participação

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você decidir participar deste estudo, você poderá desistir a qualquer momento sem que você seja penalizado. A sua assinatura provará que você leu, entendeu e deu o seu consentimento para participar desta pesquisa. Sua assinatura também provará que você está recebendo uma cópia deste documento.

Nome do participante (letra de forma)

Testemunha: nome e RG

Assinatura

____/____/____
Data

1.2 Pacientes com Tuberculose

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia – GO.CEP 74605-050
Fone (062)3521.1837 – 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

Consentimento de Participação na pesquisa

Título do projeto: **Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos.**

Nome do pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, DVM, Ph.D.
Contato para problemas e dúvidas decorrentes desta pesquisa: Dr. João Alves de Araújo Filho, Médico, telefone: 62 3225-4971.

Você está sendo convidado a participar, voluntariamente, em uma pesquisa que será conduzida na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-Goiás). Esta pesquisa tentará identificar proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença tuberculose) que são reconhecidas pelo sangue (soro e células) de pessoas saudáveis e pacientes com tuberculose.¹

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para: a) explicar o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. b) o seu sangue será coletado (20 mL). Se você decidir não participar da pesquisa, você não terá seu tratamento ou assistência interrompida. Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que o seu tratamento ou acompanhamento pelo Hospital de Doenças Tropicais seja interrompido (Goiânia, Goiás, Brasil).

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Para coletar o seu sangue, o seu braço será limpo e esterilizado com álcool, depois de garrotear a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringas estéreis. Para a coleta, será usada uma seringa de 20 mL. Não é possível identificar todos os problemas que podem ocorrer durante esse procedimento, mas nós (médico, enfermeira e o pesquisador) tomamos todas as medidas para minimizar os riscos desconhecidos desse procedimento.

Os resultados sobre a sua saúde e dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pela pesquisadora responsável. Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados numa revista científica internacional.

Participação

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se você decidir participar deste estudo, você poderá desistir a qualquer momento sem que você seja penalizado ou perca a sua assistência no Hospital de Doenças Tropicais. A sua assinatura provará que você leu, entendeu e deu o seu consentimento para participar desta pesquisa. Sua assinatura também provará que você está recebendo uma cópia deste documento.

Nome do participante (letra de forma)

Testemunha: nome e RG

Assinatura

____/____/____
Data

2- Questionários Aplicados aos Voluntários

2.1 Controles Saudáveis

Registro número:

Questionário do Projeto: Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress.

Dados:

Nome:

Data admissão:

Número na pesquisa:

Data nascimento:

Idade: [] anos

Endereço:

Fone:

Cor pele:

Sexo: F[] M[]

Profissão:

Anamnese:

Teve contato com TB ativa?

Sim []

Não []

Não sabe []

Teve contato com hanseníase?

Sim []

Não []

Não sabe []

BCG: Sim [] Não [] número de doses: []

Data da última dose:

PPD: Sim [] Não [] Resultado [] mm

Uso de medicamentos: Sim [] Não [] Qual?

Data início:

Complicações:

Doenças:

Prévia : sim [] não [] Qual?

Crônica: sim [] não [] Qual?

Doença pulmonar? sim [] não [] Alergia? sim [] não []

[]

Nos últimos dias teve:

Febre? sim [] não []

Dores musculares? sim[] não[]

Está gripado ou resfriado?

sim [] não []

Fumante? sim [] não []

Etilista? sim [] não []

2.2 Pacientes com Tuberculose

Prontuário número:

Questionário do Projeto: Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress.

Dados:

Nome:
 Data admissão: Número na pesquisa:
 Data nascimento: Idade: [] anos
 Endereço:
 Fone: Cor pele: Sexo: F[] M[]
 Profissão: Hipótese diagnóstico:

Exames:

Escarro: AAFB + [] - []
 Biopsia: Resultado: pos. [] neg. [] Tecido:
 Cultura: Resultado: pos. [] neg. [] Meio:
 HIV: Resultado: pos. [] neg. []
 PPD: [] mm Outros:
Mycobacterium

Teve contato com TB ativa? Sim [] Não [] Não sabe []
 Teve contato com hanseníase? Sim [] Não [] Não sabe []
 BCG: Sim [] Não [] número de doses: [] Data da última dose:

TB ativa no momento? Sim [] Não [] Não sabe [] Data do início:
 É tuberculose primária? Sim [] Não [] Não sabe []
 Lesão Cavitária: [] Área afetada:
 Não cavitária: [] Pleural: [] Outra:

História prévia de TB Com que idade? [] anos
 Foi uma tuberculose primária? Sim [] Não [] Não sabe []
 Existe evidência de lesões? Sim [] Não [] Não sabe []

Tratamento anti TB Data de início:
 INH: Sim [] Não [] Não sabe [] ETH: Sim [] Não [] Não sabe []
 RIF: Sim [] Não [] Não sabe [] PYZ: Sim [] Não [] Não sabe []
 STP: Sim [] Não [] Não sabe []

Resultado da quimioterapia

Ainda no tratamento? Curado [] Voltou [] Morte []
 Uso de corticóide? Sim [] Não [] Qual?
 Data início: Complicações:

Doenças:

Concomitante: Sim [] Não† Qual?
 Prévia: Sim [] Não† Qual?
 Crônica: Sim [] Não† Qual?

3- Documentos Referentes a Aprovação do Projeto de Pesquisa

3.1 Parecer da Diretoria do IPTSP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. IPTSP
Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia – GO.CEP 74605-050
Fone (062)3521.1837 – 3209.6102 - FAX (062)3521.1839

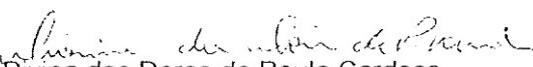
C E R T I D ã O

Certificamos que em reunião do Conselho Diretor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, realizada no dia 27 de outubro de 2004, foram discutidos e aprovados os seguintes projetos de pesquisa: "Perfil sócio-demográfico e clínico epidemiológico dos pacientes portadores de infecção HIV/aids atendidos no Serviço de Atendimento Especializado (SAE), Goiânia, de 2001-2004" - Responsável: Prof^a. Ms. Ana Maria de Oliveira; "Prevalência de microorganismos Gram-negativos produtores de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) em sítios estéreis em Hospitais de Goiânia " – Responsável: Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta; "Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes do Mycobacterium tuberculosis induzidos pela resposta imune de pacientes tuberculosos" – Responsável: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis; "Atividade Antimicrobiana do Álcool Etílico 70,0% em Canetas Odontológicas de Alta Rotação" – Responsável: Prof. Dr. Cleômenes Reis.

Goiânia, 28 de outubro de 2004


Edson Fernando Kozlowski
Secretário do IPTSP/UFG

Tendo em vista Certidão expedida, encaminhe-se à Prof^a. Dr^a. Lucimeire Antonelli da Silveira, para os devidos fins.


Prof^a. Dr^a. Divina das Dores de Paula Cardoso
Diretora do IPTSP/UFG

3.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa- UFGO



PROTOCOLO Nº 01
26/01/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação:

- Título do projeto: Caracterização dos antígenos protéicos naturais e recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress pela resposta imune de pacientes tuberculosos.
- Pesquisador Responsável: Ana Paula Junqueira Kipinis
- Instituição responsável: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/ UFG
- Data de apresentação ao COEP: 26/01/2005

II – Objetivos:

Identificar antígenos protéicos de *M tuberculosis* capazes de discriminar pacientes tuberculosos de sadios. Determinar o padrão de reconhecimento destes antígenos por células T CD4/CD8, selecionar antígenos candidatos à vacina.

III – Sumário do projeto:

- **Descrição e caracterização da amostra:**
 - Pacientes tuberculosos recrutados no ambulatório de tuberculose do Hospital de Doenças Tropicais.
 - Os controles serão convidados entre funcionários, estudantes, e/ou estagiários do HDT ou IPTSP
- **Critérios de inclusão e exclusão:** Serão 50 pacientes:
 - 1) tuberculosos com tuberculose pulmonar com idade de 30 a 60 com diagnóstico comprovado pela reação positiva ao PPD
 - 2) Pacientes com outras doenças que acometem o pulmão
 - 3) Pacientes hansênicos.
 - 4) Pacientes controles com idade e sexo pareados para cada paciente com tuberculose.
- **Adequação da metodologia:**
 - Adequada para o objetivo proposto.
- **Adequação das condições:**
 - adequado

IV – Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

O projeto visa a caracterização de antígenos para futuros candidatos a vacinas a tuberculose através de seleção de antígenos que estimulem uma resposta imune protetora em pacientes sadios e doentes *in vitro*. Os laboratórios envolvidos possuem as condições necessárias para o desenvolvimento do projeto. A identificação de antígenos candidatos a vacina não fornecerá um benefício direto ao

paciente (além da informação do número de células CD4 e CD8 em seu sangue), como é esclarecido no termo de consentimento, porém poderá fornecer grandes benefícios à comunidade. O paciente será acompanhado e tratado da mesma forma, independente de participar ou não do projeto, sendo garantido o sigilo de sua identidade. A coleta de 20 mL de sangue do paciente oferece um risco mínimo para este, portanto, a análise de riscos e benefícios justifica a execução do trabalho. Os pesquisadores mencionam a utilização de soro estocado de pacientes com hanseníase, entretanto, não apresenta um termo de consentimento Livre e esclarecido para utilização destes soros no projeto atual. A não utilização destes soros não compromete a pesquisa, porém, os pesquisadores devem enviar ao comitê de ética da UFG o TCLO demonstrando que os pacientes estão cientes da utilização destes soros, caso queiram utilizá-lo.

Diante do exposto, sou favorável a aprovação do mesmo.

VI – Data da reunião: 25/02/2005

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'E' and 'M'.

3.3 Parecer do SUS e Secretaria

Goiânia, 04 de março de 2005

Sra. Pesquisadora
ANA PAULA KIPINIS
Proponente de Projeto no Programa Pesquisa para o SUS - C&T em Saúde em
Goiás

Prezada Pesquisadora!

Com satisfação vimos comunicar que seu projeto intitulado
/Caracterização dos antígenos proteicos naturais e recombinantes do
Mycobacterium tuberculosis pela resposta imune de pacientes tuberculosos
atendidos pelo Sistema Único de Saúde de Goiânia/ foi APROVADO, com
valor integral, conforme solicitado.
Estaremos proximoamente convocando para concretizar a concessão dos
recursos solicitados, tão logo sejam disponibilizados.
Recomendamos providenciar documentação, conforme exigências do Edital.

Atenciosamente

Comitê Gestor
Pesquisa para o SUS - C&T em Saúde Goiás
SECTEC-GO

--

Esta mensagem foi verificada pelo sistema de antivírus e
acredita-se estar livre de perigo.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, S/N- Setor Universitário - Goiânia-GO - CEP 74605-050- Fone:(062) 209-6103/09

Ofício nº 069/05

Goiânia, 15 de março de 2005

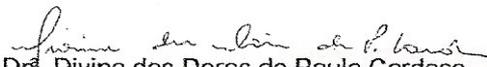
Da Diretora do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG
À Dep. Profª. Raquel Teixeira
MDª. Secretária de Ciências e Tecnologia do Estado de Goiás
Assunto: Termo de aceitação

Senhora Secretária,

Juntamente com nossos cumprimentos, apresentamos a V. Sª. o presente Termo de Aceitação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como Instituição executora do projeto "Caracterização dos antígenos naturais e recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* induzidos em condições de stress pela resposta imune de pacientes tuberculosos atendidos pelo SUS - Goiânia", sob a responsabilidade da Pesquisadora Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos,

Atenciosamente,


Profª. Drª. Divina das Dores de Paula Cardoso
Diretora do IPTSP/UFG