

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DE
BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS COM
MYCOBACTERIUM BOVIS E AVALIAÇÃO DE VACINA DE
SUBUNIDADE PROTÉICA PARA TUBERCULOSE EM
CAMUNDONGOS**

Ediane Batista da Silva
Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis

GOIÂNIA
2008

EDIANE BATISTA DA SILVA

**ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DE
BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS COM
MYCOBACTERIUM BOVIS E AVALIAÇÃO DE VACINA DE
SUBUNIDADE PROTÉICA PARA TUBERCULOSE EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:
Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis
IPTSP/UFG

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. André Kipnis - IPTSP/UFG

GOIÂNIA
2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre deram asas aos meus sonhos, permitindo-me voar. Pelo amor e apoio incondicional dedico.

O sábio lê livros mas lê também a vida. O universo é um grande livro, e a vida é uma grande escola (Lin Yutang)

AGRADECIMENTOS

Sempre acreditei que não importa o ponto de chegada, mas o caminho percorrido. Sendo assim, considero essa conquista uma longa trajetória, que seria praticamente impossível, caso não tivesse o apoio de algumas pessoas e instituições ao longo do árduo e maravilhoso mundo da ciência.

Em primeiro lugar agradeço ao PAI criador pela vida, pelos amigos, pelas dificuldades, pela fé, pela perseverança e por me fazer acreditar que seria capaz de romper os limites sócio-econômicos e chegar ao doutorado. Agradeço por todas as coisas boas que tenho recebido e pela sabedoria para entender o que momentaneamente foi ruim, mas que fizeram parte do aprendizado.

Agradeço à minha maravilhosa, compreensiva e grande família. Especialmente aos meus avós, pelo cuidado de sempre. Aos pais e irmãos pelo amor incondicional.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis, uma das pessoas mais incríveis e inteligentes que já conheci. Agradeço profundamente por compartilhar tão generosamente o seu conhecimento e a sua amizade. Obrigada pela oportunidade de aprendizado diário da pura ciência com ética e sabedoria. Sou eternamente grata por cada incentivo nos vários momentos difíceis e pela proeza de me fazer acreditar que estava no caminho certo, além das chances de nos deixar tentar errar e acertar. Suas distintas qualidades é a minha fonte de respeito e admiração.

Ao co-orientador Prof. Dr. André Kipnis, pelas sugestões neste trabalho, pela disposição e boa vontade em ajudar sempre que solicitado.

Aos amigos do laboratório de imunopatologia das doenças infecciosas: Eduardo, Rafael, Arioldo, João, Hidelbrando, Hérica, Michelle, Cristina, Loanda, Cinthya, Mayara e Rogério, pelas críticas e agradável convivência durante esses anos de doutorado. Agradeço especialmente a acadêmica de Biomedicina Bruna Daniella da Silva Souza, a “pequena grande cientista”, pelo prazer em trabalharmos juntas e dividir as coisas boas e as que não saiam como o esperado durante a realização de experimento.

À minha amiga Karyne Oliveira Coelho, que desde sempre me incentivou e me fez enxergar possibilidades onde aparentemente ninguém as notavam. Não poderia deixar de agradecê-la pelo carinho, críticas construtivas e pelos vários momentos que somente ela poderia me resgatar da introspecção e trazer um pouco de conforto para a alma. Foi muito importante o seu apoio na minha jornada acadêmica e portanto para a construção dessa tese.

À companheira, quase irmã, Liliana Borges de Menezes pela amizade desde o início da minha vida acadêmica, quando nem pensava na possibilidade de fazer ciência. Pela presença em todo

os momentos de alegria e tristeza, pela compreensão e opiniões sensatas e por sempre estar disposta a auxiliar em qualquer circunstância ou situação.

Aos mestres que foram fonte de admiração e motivo de superação de cada dificuldade e aos professores que fizeram parte da banca de qualificação. Profa. Dra. Andrea Caetano da Silva, Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno, Profa. Dra. Mara Silva Carvalhares e Profa. Dra. Wília Marta Elsner D. Brito pelas críticas e sugestões oportunas.

À Rosana Rezende Moraes “in memoriam” pela primeira oportunidade dada no acompanhamento de uma pesquisa. A “English Teacher” Linne pela perseverança no ensino de inglês, que foi de suma importância em algumas conquistas da minha vida. A amiga Beatriz Kipnis pela assistência na fala e escrita em Inglês.

Aos amigos que embora não participaram ativamente da elaboração desse trabalho, mas me deram apoio moral, estando do meu lado em qualquer ocasião: Verônica, Elcimar, Vitória, Mara e Eduardo.

À Ivete Moura, Alline de Paula Reis e Marco Silva e que ajudaram na coleta.

À AGRODEFESA, na pessoa dos médicos veterinários William Vilela e Carla Geovanna Nunes de F. L. Coelho, pela parceria no Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, sem os quais seria impossível o desenvolvimento deste trabalho. Aos proprietários que permitiram a coleta de sangue e acompanhamento do abate de seus animais.

À universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária. À CAPES pela bolsa de doutorado e pelo projeto CAPES-MÊS-CUBA que viabilizou a conclusão desse projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 Aspectos gerais sobre tuberculose bovina	2
3 Aspectos gerais da resposta imune em tuberculose bovina.....	4
4 Resposta imune inata à infecção por <i>Mycobacterium bovis</i>	6
5 Resposta imune efetora à infecção por <i>Mycobacterium bovis</i>	7
5.1 Subpopulações de células T envolvidas na tuberculose bovina.....	9
5.1.1 Linfócitos TCD4+	9
5.1.2 Linfócitos TCD8.....	10
5.1.3 Linfócitos T _H 1.....	11
5.2 Principais citocinas e outras células envolvidas na resposta imune ao <i>M. bovis</i>	12
5.2.1 IFN- γ	12
5.2.2 TNF- α	14
5.2.3 Interleucina-2 (IL-2)	14
5.2.4 Interleucina-4 (IL-4)	15
5.2.5 Interleucina-12 (IL-12)	15
5.2.6 Macrófagos.....	15
5.2.7 Natural Killer (NK)	16
6 Formação de granulomas.....	17
7 Principais antígenos de <i>Mycobacterium bovis</i> reconhecidos na resposta imune	19
8 Métodos de diagnóstico para tuberculose bovina	21
8.1 Identificação do agente	24
8.1.2 Diagnóstico molecular	25
8.1.2.1 Reconhecimento de ácido nucléico	25
8.1.3 Diagnósticos imunológicos.....	27
8.1.3.1 Reação de Hipersensibilidade.....	27
8.1.3.2 Testes laboratoriais baseados nos componentes do sangue (células, moléculas e soro).....	30
9 Vacinas contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33

9.1 Vacinas com microrganismos vivos (BCG, <i>M. tuberculosis</i>)	34
9.2 Vacinas de DNA e subunidades	35
9.3 Vacinas com vetores vivos	38
10 Objetivo	38
10. Referências Bibliográficas	39
CAPÍTULO 2- The use of MPT-51, BCG and Ag85 as antigen in an ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis.....	68
CAPÍTULO 3- Bovinos tuberculosos, naturalmente infectados, apresentam células TCD4+IL-4+ específicas preservando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.....	86
CAPÍTULO 4- Eficácia do antígeno MPT-51 recombinante na vacinação contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	106
CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS	132

LISTA DE ABREVIATURAS

$\gamma\delta$	Gama-Delta
72F	Proteína de fusão de 72 kDa
Ag85	Antígeno 85
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
CD	Domínios de diferenciação celular
CFP10 (Rv3874)	Proteína do filtrado de cultura de 10 kDa
CpG DNA	Ácido desoxiribonucléico contendo citidina fosfato guanosina
CTLs	Linfócito T CD8 citotóxico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DOT	Tratamento diretamente observado
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GroES Rv3418c	Malato Sintetase do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ESAT-6,	Antígeno de secreção primária de 6 kda
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HSP	Proteína do choque térmico
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IS 610 e 1087	Seqüência de inserção IS6110 e IS1081,
KDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB	Enterotoxina lábil da <i>Escherichia coli</i>
MDR	Multi Droga Resistente
MHC	Molécula de Histocompatibilidade Principal
MPB64	Proteína de <i>M bovis</i> de 64 kDa
MPB70	Proteína de <i>M bovis</i> de 70 kDa

MPB83	Proteína de <i>M bovis</i> de 83 kDa
MPT-51 (Rv3803c)	Proteína de <i>M tuberculosis</i> 51
MPT64	Antígeno de <i>M. tuberculosis</i>
Mtb <i>drnC</i>	Genes presentes no <i>M. tuberculosis</i> que codificam peptídeos similares ao transportadores ABC
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintetase 2
O.D.	Densidade óptica
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PPD-A	Derivado de proteína purificada de <i>Mycobacterium avium</i>
PPD-M	Derivado de proteína purificada de <i>Mycobacterium bovis</i>
RD-1	Região de Diferença 1
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossômico
SPSS	Pacote de Análise Estatística para Ciências Sociais
TB MDR	Tuberculose multi droga resistente
TB PNA FISH	Fluorescência de hibridização <i>in situ</i> de peptídeo de ácidos nucleicos de <i>M. tuberculosis</i>
TB10.4	Antígeno de <i>M. tuberculosis</i> de 10.4 kDa
TB27.4	Antígeno de <i>M. tuberculosis</i> de 27.4 kDa
TCD4 ⁺	Linfócito T com marcador de superfície CD4
TCD8 ⁺	Linfócito T com marcador de superfície CD8
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator transformador-beta de crescimento
Th	Linfócito T helper
TPX	Tireodoxine peroxidase
TTI	Teste de Tuberculina Intradérmico
UFC	Unidade formadora de colônia

TB XDR

Tuberculose super droga resistente

WHO

Organização Mundial de Saúde

RESUMO

Nesta tese foram avaliados vários aspectos da tuberculose bovina e do *Mycobacterium bovis*. Primeiro caracterizou-se a imunogenicidade do MPT-51, Ag 85 e BCG em ensaio imunoenzimático, onde foram utilizadas 208 amostras de soro de animais TTI positivo e 54 amostras de bovinos negativos. O BCG-*M. bovis* e o Ag 85 foram fortemente reconhecidos pelos anticorpos dos bovinos naturalmente infectados. Segundo correlacionou-se o estado clínico do animal à positividade ao teste intradérmico, com a produção específica de IL-4 por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e a produção de óxido nítrico por macrófagos do sangue periférico de bovinos naturalmente infectados com tuberculose. Foi observado que os bovinos TTI positivos apresentaram células CD4⁺IL-4⁺ específicas para extrato protéico de *M. bovis*-BCG. Observaram-se altos níveis basais de linfócitos TCD8⁺IL-4⁺ independente de estímulos nos animais reatores. Quando as culturas foram estimuladas com extrato protéico de BCG, não houve diferença quanto à produção de NO. Os bovinos tuberculosos, naturalmente infectados, apresentaram células TCD4⁺IL4⁺ específicas para *M. bovis*-BCG, preservando a produção de NO pelos macrófagos. Finalmente, a imunogenicidade do MPT-51 como vacina de sub-unidade protéica foi avaliada em camundongos BALB/c, testando o MPT-51 com dois adjuvantes, o incompleto de Freund e o CpG DNA. Os camundongos foram imunizados e posteriormente desafiados com *M. tuberculosis*. No pulmão, a imunização com antígeno rMPT-51 a 20µg/ml + adjuvantes de Freund Incompleto e CpG DNA induziu aumento da migração de células TCD5⁺IFN- γ ⁺ específicas para o MPT-51 para o local da infecção, quando comparados com o controle (p<0,05). O MPT-51+CpG DNA, apresentou melhor desempenho dentre os esquemas de vacinação adotados, devido a capacidade de estimular a produção de células TCD5⁺IFN- γ ⁺ e a diminuição da carga bacteriana, preservando assim a integridade funcional do pulmão dos camundongos, quando desafiados.

Palavras-chave Antígenos recombinantes, BCG, bovino, diagnóstico, tuberculose, vacina

ABSTRACT

Several aspects of the bovine tuberculosis were analyzed in this study. The immunogenicity of recombinant MPT-51 (rMPT-51), Ag-85 and *M. bovis*-BCG were characterized in an immunosorbent assay, where 208 serum samples from positive intradermal tuberculin test (ITT) animals and 54 serum samples from ITT negative animals were analyzed. *M. bovis*-BCG and Ag-85 were strongly recognized by antibodies from naturally infected cattle. Additionally, the clinical status of the animals were correlated with the ITT positivity, with the specific production of IL-4 by TCD4 and TCD8 positive lymphocytes, and with nitric oxide (NO) production by macrophages from naturally tuberculosis infected bovine peripheral blood. ITT positive animals showed TCD4⁺IL4⁺ cells specific to *M. bovis*-BCG extract. High background levels of TCD8⁺IL-4⁺ lymphocytes were observed in ITT positive animals independent of the stimuli. When cell cultures were stimulated with *M. bovis*-BCG protein extract, there was no observed difference in NO production between the groups. Naturally tuberculosis infected bovine presented TCD4⁺IL4⁺ cells specific for *M. bovis*-BCG and a preserved NO production. Finally, the immunogenicity of rMPT-51 use as a proteic sub-unit vaccine was evaluated in BALB/c mice, with two different adjuvants, incomplete Freund and CpG DNA. For this, mice were immunized and challenged with *M. tuberculosis*. Immunization with rMPT-51 antigen and either adjuvant induced, in the lungs, a migration increase of TCD5⁺IFN γ ⁺ cells specific for rMPT-51, when compared to controls (P<0.05). rMPT-51 plus CpG DNA presented a better performance among the different vaccination schemes tested, in part due to the ability of stimulate TCD5⁺IFN γ ⁺ cells and hampering the bacterial load, thus preserving the functional integrity of challenged mice lungs.

Key-words: Recombinant antigens, BCG, bovine, diagnostic, tuberculosis, vaccine

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das mais antigas enfermidades conhecidas e até os dias atuais continua ameaçando a saúde do homem e dos animais. Sabe-se que um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e estima-se que a cada ano ocorre oito milhões de novos casos, causando 3 milhões de mortes em humanos e infecção de 300 milhões de bovinos.

Para controle e erradicação dessa enfermidade dos rebanhos bovinos mundiais e diminuição do risco potencial à saúde humana, são necessários diagnósticos e métodos preventivos eficazes além de abate dos animais reagentes. Nesse sentido, requer-se um amplo conhecimento da resposta imunológica ao *Mycobacterium bovis*, pois, a forma pela qual a resposta imune está envolvida no progresso da doença é crucial para a compreensão da tuberculose bovina.

A partir do estudo da resposta imune à tuberculose e principalmente devido à falta de praticidade e elevado número de resultados falso-positivo e falso-negativo do teste intradérmico de tuberculina (TTI), pesquisamos um teste baseado na resposta imune humoral. O ensaio imunoenzimático utilizou três antígenos para aplicação no diagnóstico da tuberculose bovina.

Uma vez que a proteção à infecção é realizada principalmente pela resposta imune celular, estudou-se também as células TCD4⁺IL-4⁺ e TCD8⁺IL-4⁺ e a produção de óxido nítrico pelas células mononucleares para compreensão da função dessas células e moléculas durante a enfermidade.

Entendendo-se a necessidade de controlar a tuberculose antes da sua instalação nos indivíduos realizou-se um protocolo de vacinação utilizando-se uma subunidade protéica, o MPT-51, adicionada a dois adjuvantes com o propósito de avaliar o controle da infecção quando os camundongos eram desafiados com *Mycobacterium tuberculosis* e com perspectivas de aplicar esse protocolo de imunização em bovinos e humanos no combate da tuberculose nos animais e em humanos.

2 Aspectos gerais sobre tuberculose bovina

A tuberculose bovina (TB bovina) é uma enfermidade crônica caracterizada por lesões granulomatosas, associadas principalmente ao trato respiratório e aos linfonodos (NEILL et al., 1994).

A doença é causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e possui distribuição mundial, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento e em criações intensivas, como em rebanho leiteiro. BELCHIOR (2001) encontraram prevalência geral de 5% de rebanhos positivos e 0,8% de animais positivos para tuberculose bovina no estado de Minas Gerais. A maior frequência de casos de tuberculose bovina concentra-se na América do Sul, que também detém a maior população bovina. Na América Latina e Caribe existem aproximadamente 300 milhões desses animais, dos quais 73,7% estão alojados em áreas com prevalência de tuberculose maior do que 1%. Estima-se que o Brasil e a Argentina juntos possuam 3,5 milhões de bovinos infectados pelo bacilo da tuberculose, espalhados por todo o território, o que representa quase 2% da população existente nesta área (KANTOR & RITACCO, 1994).

Atualmente já se encontra em execução o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), cujo objetivo é diminuir o impacto negativo dessa zoonose e promover a competitividade da pecuária nacional. Já que de acordo com as notificações oficiais, o país ainda mantém uma prevalência média nacional de 1,3% (no período de 1989 a 1998). Não existem dados oficiais acerca da prevalência da tuberculose em dias atuais no Estado de Goiás (LAGE et al., 2006).

Ao avaliar os principais fatores de risco associados à tuberculose bovina, GONÇALVES (1998) citou o confinamento de animais por longos períodos e o intenso trânsito de bovinos para a compra e venda desses animais.

O diagnóstico dessa enfermidade pode ser feito *in vivo* pelo exame clínico e o teste tuberculínico intradérmico; ou *post-mortem* por exames histopatológico e bacteriológico, que incluem isolamento do agente por técnicas padrões e avançadas (HAAGSMA, 1995). Até o presente, segundo o Manual Técnico do PNCEBT (2006) o diagnóstico padrão para a tuberculose bovina é o TTI, cujo princípio é avaliar a resposta de hipersensibilidade tardia mediada por

linfócitos T sensibilizados, em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose.

A principal via de infecção dos bovinos adultos é através da inalação de partículas de aerossol e a via digestiva é o principal mecanismo de contaminação dos bezerros (LAGE et al., 2006), no entanto, o processo da exposição ao bacilo e o desenvolvimento da doença não estão totalmente esclarecidos (POLLOCK, et al., 2006).

Quando a via de infecção ocorre pelo trato respiratório, por meio de aerossóis, o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos regionais. Na primo infecção pulmonar os bacilos se alojam no tecido, promovendo uma reação inflamatória, denominada pneumonia. A doença se instala basicamente nos pulmões, formando nódulos caseosos, de tamanhos variados, atingindo todo o parênquima pulmonar e formando lesões cavitárias. Quando a resistência orgânica do animal é baixa ocorre disseminação do agente pelo parênquima pulmonar, por via aérea ou pela via hematogena, alcançando os linfonodos regionais e formando metástases em outros órgãos. No foco inicial ocorre infiltração celular, necrose de caseificação e circunscrição da lesão, que pode evoluir para resolução e calcificação. Já quando a penetração do bacilo é pela via digestiva, a lesão inicial se dá no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. Entretanto, pode atingir praticamente todos os órgãos quando ocorre a generalização do processo (PRITCHARD, 1988; O'REILLY & DABORN, 1995).

Após a infecção por *M. bovis* observa-se na lesão uma infiltração de células mononucleares, incluindo macrófagos e linfócitos (CASSIDY et al 2001). Sendo que os macrófagos são as primeiras células onde ocorre o crescimento intracelular de *M. bovis*, seguido pela deposição do bacilo na superfície respiratória, posteriormente outras células do sistema imune inato e adquirido são envolvidas (NEILL et al., 2001).

Quanto à associação da resposta imune e o desenvolvimento da enfermidade, o começo da resposta imune celular está associado com o desenvolvimento de lesões visíveis. A progressão de lesão está associada com o elevado potencial de transmissão da doença (CASSIDY et al., 1998; McCORRY et al., 2005).

3 Aspectos gerais da resposta imune em tuberculose bovina

A resposta imune ao *M. bovis* é uma complexa interação entre patógeno-hospedeiro e o conhecimento detalhado dessa interação, nos bovinos naturalmente infectados, é limitado. Alguns estudos da resposta imune têm sido realizados em modelos experimentais (BOOM, 1996; POLLOCK et al., 2001).

Estudos imunohistológicos de lesões granulomatosas em bovinos, causados pela infecção experimental de *M. bovis*, indicam que as células T são as primeiras células envolvidas nessa reação (CASSIDY et al., 2001). POLLOCK et al. (2001) afirmaram que a resposta imune mediada por células é importante tanto nos animais natural quanto nos experimentalmente infectados.

Segundo POLLOCK et al. (1996), todos os tipos de linfócitos T ($\gamma\delta$, CD4 e CD8) estão envolvidos na resposta imune anti-micobacteriana nos bovinos. Os autores acrescentaram ainda que a importância da defesa contra patógenos intracelulares é estabelecida na resposta imune Th1 que é caracterizada pela produção de IFN- γ , cuja presença é essencial para a ativação da função microbicida de macrófagos.

Nos bovinos infectados com *M. bovis*, as células TCD4⁺ de memória são a população celular dominante na produção de IFN- γ , que levam à ativação de macrófagos com capacidade anti-microbiana. As células TCD8⁺ de memória também têm sido identificadas como importantes produtoras de IFN- γ (HOPE et al., 2000; SMYTH et al., 2001), além de estarem envolvidas na lise de células infectadas (LIÉBANA et al., 2000; SKINNER et al., 2003). Segundo SMYTH et al. (2001), as células T $\gamma\delta$ são também fonte potencial de IFN- γ , apesar de menor liberação quando comparadas aos linfócitos TCD4⁺. Entretanto há evidências de que os linfócitos T $\gamma\delta$ façam uma ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo (KENNEDY et al., 2002). Segundo POLLOCK et al. (1996) e CASSIDY et al. (2001), os linfócitos T- $\gamma\delta$ estão presentes no estágio inicial da infecção e no início da formação da lesão granulomatosa.

Apesar do predomínio da resposta imune celular, existem pesquisas importantes quanto à participação da resposta imune humoral (FIFIS et al., 1994; LYASHCHENKO et al., 1998). Segundo LYASHCHENKO et al. (1998), a

resposta imune humoral de bovinos experimentalmente infectados, envolve múltiplos antígenos que são reconhecidos pelos animais em diferentes estágios da doença.

As citocinas exercem papel importante na determinação da resposta imune à infecção. MOSMANN & COFFMAN (1989) afirmaram existir o paradigma da resposta Th1/Th2. Segundo os autores, a diferença no perfil das citocinas deve-se à indução de diferentes aspectos do sistema imune. Nesse sentido, tem sido postulado que durante os estágios iniciais de infecções micobacterianas, há a predominância da resposta imune mediada por células; no entanto, com o progresso da doença pode ser observada uma alteração da relação Th1/Th2, que se associa a uma fase onde a produção de anticorpos é predominante (Figura 1) (RITACCO et al., 1991).

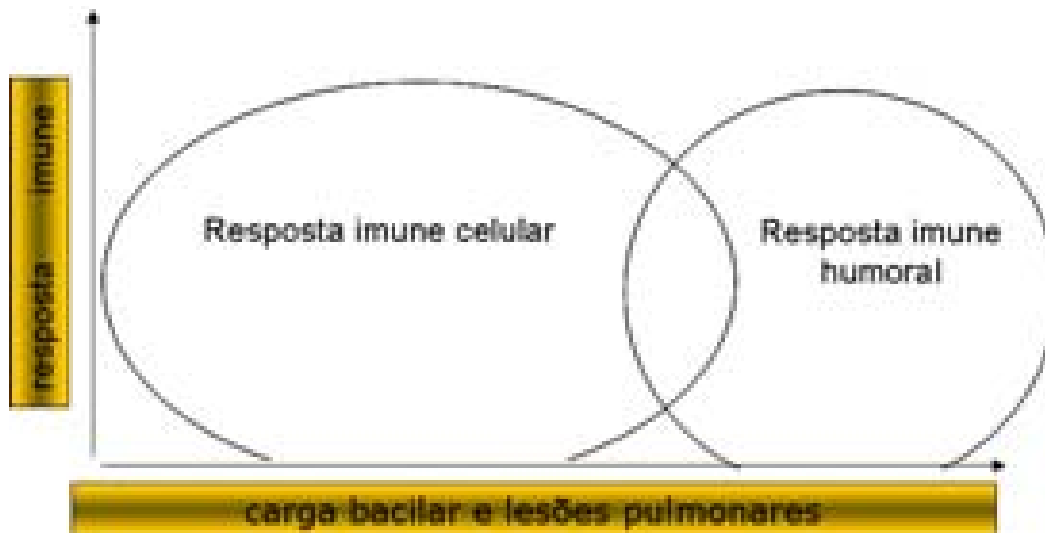


Figura 1: Representação dinâmica da resposta imune de bovinos ao *M. bovis*. A resposta imune mediada por células desenvolve-se inicialmente e a humoral apresenta-se com o aumento da carga bacilar.

Fonte: Adaptado de POLOCK & NEILL (2002).

4 Resposta imune inata à infecção por *Mycobacterium bovis*

Após o bacilo entrar e ultrapassar as barreiras físicas do trato respiratório, os macrófagos alveolares fagocitam as micobactérias e geralmente as destroem, dependendo da capacidade microbicida intrínseca dos fagócitos do hospedeiro e ainda dos fatores de virulência dos bacilos ingeridos. As micobactérias que escapam da destruição intracelular se multiplicarão, causando a ruptura dos macrófagos. Esse evento culminará com a infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar e crescimento de bacilos nos monócitos (FLINN et al., 2001; VAN CREVEL et al., 2002).

A endocitose dos bacilos da tuberculose envolve muitos receptores que podem se ligar a micobactéria não opsonizada ou reconhecer opsoninas na superfície do bacilo (SCHLESINGER, 1993; HIRSCH et al., 1994; ADEREM & UNDERHILL, 1999)

Os receptores *Toll-like* são mediadores da imunidade inata filogeneticamente conservados essenciais para o reconhecimento micobacteriano em macrófagos e células dendríticas, que tem função de ativação dos fagócitos. Entretanto, a interação entre *Mycobacterium sp.* e macrófagos é complexa (FLYNN et al., 2001). Estudos *in vitro* usando TLR2 e/ou TLR4 expressos em macrófagos, relataram evidências de que as células são ativadas via tais receptores independente da CD14 (MEANS et al., 1999).

Vários componentes micobacterianos, incluindo AraLAM (complexo micolilarabinogalactan-peptidoglicano) e lipídio total de micobacteria podem ativar macrófagos a produzirem TNF- α dependente de TLR2 (ADEREM & UNDERHILL et al., 1999).

Os macrófagos e células dendríticas são células envolvidas na resposta imune inata à micobactéria. Essas são as células responsáveis pela apresentação do antígeno e assim para o início da imunidade adaptativa. As primeiras moléculas de MHC II apresentam a proteína micobacteriana para a célula TCD4⁺ antígeno específica. A molécula de MHC I apresenta para os linfócitos TCD8⁺ antígeno específica (MAZZACCARO et al., 1996; GELUK et al., 2000; CHO et al., 2000).

5 Resposta imune efetora à infecção por *Mycobacterium bovis*

A resposta ao patógeno bacteriano intracelular, tal como ocorre com o *Mycobacterium sp.* é denominada de hipersensibilidade tardia ou hipensensibilidade do tipo IV (DANNENBERG, 1993).

Os macrófagos interagem com a bactéria e se ativam produzindo quimiocinas e citocinas, as quais têm potencial para controlar infecções micobacterianas. A partir dessa interação o bacilo pode ser destruído e eliminado do hospedeiro ou ainda tornar-se quiescente. Nesse caso, poderá levar ao desenvolvimento de tuberculose ativa ou ser reativado da dormência em estágios futuros oportunos (WELSH et al., 2005).

As células T respondem aos antígenos micobacterianos com expansão clonal, levando ao desenvolvimento de populações celulares de memória (MONAGAHAN et al., 1994). A partir dessa etapa ocorre a liberação de citocinas tais como interleucina-2 (IL-2), TNF- α , interleucina-12 (IL-12) e IFN- γ que são responsáveis pela ativação de macrófagos (WOOD et al., 1991; O'NULLAIN et al., 1997).

Acreditava-se que somente os peptídeos derivados de proteínas de *Mycobacterium sp.* eram apresentados às células T, em moléculas de complexo de histocompatibilidade principal de classe I ou II (MHC I ou II). Entretanto, tem-se demonstrado que estruturas não protéicas como lipídeos micobacterianos, podem ser reconhecidos pelas células T de humanos em moléculas de MHC não polimórficas como CD1 (PORCELLI et al., 1992; ROSAT et al., 1999). Essa via diferente para apresentação de antígenos micobacterianos, ainda necessita de maiores estudos nos bovinos.

A imunidade mediada por células é de grande importância no controle de patógenos intracelulares. Na tuberculose, a função de proteção tem sido atribuída às células TCD4⁺, TCD8⁺ e T $\gamma\delta$ (FLYNN & CHAN, 2001). Esse papel tem sido comprovado a partir de experimentos em camundongos, nos quais se observou que animais em que linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ eram ausentes apresentam maior susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (BEHAR et al., 1999; CARUSO et al., 1999; FLYNN & CHAN, 2001).

Quanto à cinética dos linfócitos na resposta imune celular ao *M. bovis*, em animais experimentalmente infectados, existe o envolvimento, a princípio de células $T\gamma\delta$, posteriormente linfócitos $TCD4^+$ e nas infecções crônicas há participação proeminente do linfócito $TCD8^+$ (POLLOCK et al., 1996). Em camundongos, uma semana após a infecção com *M. tuberculosis*, o número de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ aumenta nos linfonodos associados ao pulmão, demonstrando que as duas células envolvidas devem atuar nas fases iniciais da infecção (FLYNN & CHAN, 2001).

JOARDAR et al. (2002) estudaram a dinâmica da resposta imune mediada por células à tuberculose bovina e observaram que a resposta é maior entre a 9ª, e 20ª, semanas pós-infecção. A presença inicial das células $T\gamma\delta$ foi seguida pela predominância de $TCD4^+$ e finalmente pelas $TCD8^+$. A atividade efetora dos linfócitos foi observada durante a 9ª e 20ª semanas. Já a resposta citotóxica foi evidente na 12ª semana pós-infecção. A cinética das citocinas liberadas quando avaliadas *in vitro* tais como a IL-2 e IFN- γ , elevaram-se entre a 9ª e 20ª semanas pós-infecção.

Quanto a quantidade de bacilos necessária para causar lesão, McCORRY et al. (2005) estudaram dois grupos de bovinos, sendo um grupo de bezerras infectado com elevada dose (10^6 CFU) e outro grupo com baixa dose (10^4 CFU) de *M. bovis*. Decorridos 6 meses após a infecção, os animais foram sacrificados e submetidos ao exame *post-mortem*. Para cada animal foi atribuído um escore, baseado na existência das alterações patológicas. Os animais infectados com altas doses tiveram maior escore e desses, 18% foram positivos para *M. bovis* quando realizou-se *swab* nasal e posterior isolamento do microorganismo.

A caracterização do desenvolvimento de alterações patológicas nos bovinos foi estudada por CASSIDY et al. (1999), infectando bovinos jovens experimentalmente com *M. bovis*. Vários parâmetros de desenvolvimento da resposta imune celular em diferentes estágios da doença foram observados. Segundo os autores, a produção do IFN- γ foi anterior ao desenvolvimento da resposta proliferativa dos linfócitos e a primeira lesão granulomatosa foi evidente após a resposta proliferativa dos linfócitos.

5.1 Subpopulações de células T envolvidas na tuberculose bovina

Estudos direcionados à tuberculose humana e em modelos murinos de infecção têm indicado que diversas subpopulações de células T apresentam funções importantes, na resposta imune anti-micobacteriana (POLLOCK et al., 2001). As células TCD4⁺, MHC II restritas, tem sido consideradas células chave na resposta imune micobacteriana. Entretanto, as células TCD8⁺ e MHC I restritas, também apresentaram função protetora contra esse tipo de microorganismos (BEHAR et al., 1999). Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ expressam receptores de antígenos $\alpha\beta$ (KUNG, 1987). Nenhuma dessas subpopulações de linfócitos T poderá repor a função anti-micobacteriana de outras (CARUSO et al., 1999).

Nos bovinos, tem sido designada uma terceira subpopulação de linfócitos, o T $\gamma\delta$, que desempenha importante função de proteção contra agentes mycobacterianos (VESOSKI et al., 2004). Esses linfócitos são CD3⁺ e expressam TCR $\gamma\delta$ (BRENNER et al., 1986; KUNG, 1987).

5.1.1 Linfócitos TCD4⁺

Segundo LIÉBANA et al. (1999), as células TCD4⁺ de bovinos infectados por *M. bovis* proliferam na presença de antígenos micobacterianos. Essas células produzem citocinas, que ativam macrófagos infectados para destruir a bactéria intracelular.

Outra possível função dos linfócitos TCD4⁺ é a sua atividade citolítica contra monócitos infectados com micobactérias, sendo esta já observada em humanos e em camundongos (TAN et al., 1997). Contudo, esse mecanismo efetor ainda não é conclusivo com dados obtidos a partir de estudo nos bovinos (LIÉBANA et al., 2000). SKINNER et al. (2003) avaliaram a atividade citolítica dos linfócitos T na defesa contra infecção na tuberculose bovina. Os autores observaram que as células citolíticas possuem habilidade específica para lisar macrófagos infectados com *M. bovis*, entretanto, os principais linfócitos com tal atividade foram os TCD8⁺.

Quanto à avaliação da ativação de células TCD4⁺ em infecção tuberculosa, sabe-se que em camundongos, as células TCD4⁺ que estão presentes no local da infecção por *M. tuberculosis*, possuem um fenótipo

ativado, definido pelo aumento da expressão de CD25, CD44 e CD69 e diminuição da expressão de CD62L (ANDERSEN & SMELEGAARD, 2000 JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2005). Nos bovinos, em resposta ao derivado de proteína purificada (PPD), células TCD4⁺ infectadas por *M. bovis* apresentam também CD25 e CD44 e diminuem a expressão de CD62L.

5.1.2 Linfócitos TCD8⁺

Assim como os linfócitos TCD4⁺, os TCD8⁺ de bovinos infectados por *M. bovis* proliferam significativamente na presença de antígenos micobacterianos, entretanto, essas células respondem não apenas ao *M. bovis* intacto, mas também ao seu antígeno solúvel (LIÉBANA et al., 1999).

A principal função efetora dos linfócitos TCD8⁺ é a lise de células infectadas, o que resulta na liberação do patógeno no ambiente extra-celular. Posteriormente, a bactéria poderá ser apreendida e destruída por macrófagos recém ativados (KAUFMANN, 1998).

Estudos realizados por VILLARREAL-RAMOS et al. (2003) demonstraram que as células TCD8⁺ desempenham relevante função na resposta ao *M. bovis*, na secreção de IFN- γ . Essa citocina é crucial na ativação de macrófagos e este por sua vez tem ação importante no desfecho da tuberculose, ou seja, na formação do granuloma e no controle do crescimento micobacteriano (VILLARREAL-RAMOS et al., 2003).

Estudos realizados por DELIBERO et al. (1988) demonstraram que as células T CD8⁺ podem induzir atividade tuberculostática nos macrófagos da medula óssea. O papel funcional dos CTLs na imunidade contra infecções intracelulares é o de matar as células infectadas via grânulo-exocitose, que pode liberar uma ou mais moléculas efetoras com a capacidade de matar diretamente o patógeno microbiano intracelular (STENGER & MODLIN, 1999); ou seja, as células TCD8⁺ liberam grânulos dentro dos macrófagos infectados seguido de perforina, que poderá destruir a célula hospedeira e posteriormente matar a micobactéria (STENGER et al., 1998). Entretanto, durante este mecanismo, mais macrófagos são ativados, induzindo maior atividade lítica do T CD8⁺. Nesse aspecto, VILLARREAL-RAMOS et al. (2003) alertaram quanto ao efeito deletério dessas células, pois o aumento da carga bacteriana poderá levar à destruição tecidual.

5.1.3 Linfócitos T $\gamma\delta$

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são proporcionalmente os mais numerosos dentre as células mononucleares do sangue periférico dos ruminantes (SMYTH et al., 2001). Constituem aproximadamente 75% da população circulante em animais jovens e 40% nos animais adultos (MACKAY & HEIN, 1989). Em humanos essas células T se constituem apenas 7% e nos camundongos 2 a 3% da população total (ITOHARA et al., 1989).

Uma característica importante desse TCR ($\gamma\delta$) em ruminantes é que a maioria desses receptores expressa apenas uma molécula de superfície, identificada como WC1 (MORRISON & DAVIS, 1991; WJINGAARD et al., 1992) a qual não é expressa em linfócitos T $\gamma\delta$ de humanos e camundongos (SMYTH et al., 2001). Segundo MACHUGH et al. (1997) quando alguns linfócitos T $\gamma\delta$ são WC1 negativos, expressam CD2 e CD8 e apresentam o fenótipo WC12CD21CD81/2. A porção extracelular dessa molécula possui 11 domínios ricos em cisteína (WJINGAARD et al., 1992).

Há indícios de que WC1 esteja envolvido no recrutamento de células para a formação do granuloma em tuberculose (LIÉBANA et al., 1999; POLLOCK et al., 2001). Apesar da precisa função do WC1 e até mesmo dos linfócitos T $\gamma\delta$ ainda não estarem totalmente estudados, sabe-se que desempenham função citotóxica em resposta a mitógenos, parasitas, antígenos bacterianos e virais (CHIODINI & DAVIS, 1992; AMADORI et al., 1995; COLLINS et al., 1996), dentre essas funções, inclui-se a defesa contra *M. bovis* (POLLOCK et al., 1996; SMYTH et al., 2001).

Estudo realizado por SMYTH et al., (2001), comparou a resposta *in vitro* de linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ ao *M. bovis*. Neste, observou-se que 24 horas após a exposição de antígenos de *M. bovis*, a maioria das células T $\gamma\delta$ de animais infectados tornou-se altamente ativada, comparado a baixa proporção de ativação da população de linfócitos T $\alpha\beta$. No estudo da cinética dessa resposta, as células T $\gamma\delta$ estiveram ativadas durante os sete dias de cultivo, enquanto os T $\alpha\beta$ declinaram durante esse período. Além disso, em comparação com o que foi encontrado para as células T CD4⁺, observou-se que os antígenos de *M. bovis* induzem à proliferação celular, mas relativamente pouca liberação de IFN- γ pelas células T $\gamma\delta$ WC11 purificadas.

RHODES et al. (2001) descreveram a resposta proliferativa e o efeito imunomodulatório do linfócito $T_{\gamma\delta}$ a antígenos protéicos de *M. bovis*. Segundo os autores, a proliferação de células $T_{\gamma\delta}$ na presença de antígenos como PPD-A *M*, PPD-M, ESAT-6, 6 kDa, Ag85, lipoproteína glicosilada 38 kDa, MPB64, MPB70, MPB83, HSP16.1, HSP65, HSP70, produziu elevados níveis de IFN- γ e TGF- β , entretanto, não produziu IL-2. Os autores acrescentaram ainda que ocorra supressão do efeito do $T_{\gamma\delta}$ quando há resposta simultânea de outras células como o linfócito $T_{\alpha\beta}$ pois, com a depleção do $T_{\gamma\delta}$ houve aumento da proliferação antígeno-específico em um quarto dos animais testados.

Para comprovar a função das células $T_{\gamma\delta}WC1^+$ na infecção micobacteriana de bovinos, KENNEDY et al. (2002) descreveram um modelo de tuberculose bovina *in vivo*, onde depletaram essas células tanto do sangue circulante, quanto do trato respiratório. Apesar das células $T_{\gamma\delta}WC1^+$ tornarem-se significativamente ativadas (CD25) na circulação, não foi observado efeito sobre a progressão da doença. Além disso, essas células podem iniciar a resposta imune ao *M. bovis*, contribuindo direta e indiretamente para a resposta imune em Th1. POLLOCK et al. (1996) infectaram bovinos com *M. bovis* e avaliaram a cinética do $T_{\gamma\delta}WC1^+$. Os autores observaram que após a infecção, o número dessas células aumentou proporcionalmente dentre os subtipos de linfócitos T. Somente após a mudança inicial dos $T_{\gamma\delta}WC1^+$ houve evidências do envolvimento das células $T_{\alpha\beta}$, devido a mudança na razão de células CD4:CD8.

5.2 Principais citocinas e outras células envolvidas na resposta imune ao *M. bovis*

5.2.1 IFN- γ

Na resposta celular ao *M. bovis*, as células apresentadoras de antígenos específicos liberam citocinas (D'ANDREA et al., 1992) as quais induzem as células NK e linfócitos T a produzir IFN- γ (TRINCHIERI, 1993). A presença dessas citocinas direcionam a diferenciação dos linfócitos $CD4^+$ com fenótipo Th0 em células Th1, inibindo a diferenciação e função efetora de Th2,

ou seja, direciona a resposta dominante em Th1 (MAGGI et al., 1992) e aumenta a atividade bactericida dos fagócitos (FLESCH & KAUFMANN 1987).

Os linfócitos TCD4⁺-Th1, TCD8⁺, T_H17 contribuem para a produção de IFN- γ , que é requerido no processo de ativação de macrófagos (FLYNN & CHAN, 2001). O IFN- γ é um componente indispensável na resposta antimicrobiana uma vez que camundongos com deleção gênica para o IFN- γ , ou para os seus receptores são altamente susceptíveis a infecções micobacterianas (COOPER et al., 1993; OTTENHOF et al., 1998).

DÍAZ et al. (1999) testaram a habilidade de proteínas antigênicas, de *M. bovis* em estimular a produção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico de bovinos, apresentando infecção tuberculosa. Os autores concluíram que a indução da produção dessa citocina aumenta com o progresso da doença, coincidindo com a alta reatividade de PPD no TTI. Outra característica importante quanto à produção do IFN- γ na tuberculose bovina foi que a citocina é antígeno independente no estágio anérgico da doença.

AMENI & TIBBO (2002) avaliaram a cinética do IFN- γ em resposta à vacinação com o BCG e observaram que essa citocina apresenta uma fase de ascensão imediatamente após a vacinação, seguida de declínio nas semanas seguintes à vacinação para apresentar posterior equilíbrio. Essa mudança na concentração deve ser atribuída à função de proteção contra infecção com o *M. bovis* em bovinos.

DENIS & BUDDLE (2005) avaliaram o impacto do IFN- γ sobre a interação entre *M. bovis* e macrófagos bovinos. Os autores observaram que os macrófagos secretaram pouco óxido nítrico (NO), TNF-alfa, IL-1 beta e IL-12, quando infectados com o BCG. Quando os macrófagos previamente tratados com *M. bovis* virulento foram infectados, houve liberação de elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios, mas não houve modificação na replicação bacteriana. Esse fato só foi observado quando os macrófagos foram previamente tratados com IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS). A virulência da micobactéria é um fator determinante na liberação de citocinas pelos macrófagos, o IFN- γ amplifica a liberação de citocinas pelos macrófagos e a indução da apoptose depende da liberação de TNF- α .

5.2.2 TNF- α

O TNF- α tem múltiplas funções na resposta imune à tuberculose, sendo requerido no controle da mesma. Essa citocina é um importante componente para ativação de macrófagos. O TNF- α juntamente com o IFN- γ induz a expressão de óxido nítrico sintetase induzível (NOS2) (FLESCH & KAUFMANN, 1990).

Estudos realizados por MOHAN et al. (2001) demonstraram o papel dessa citocina na formação do granuloma da tuberculose e outras doenças micobacterianas. Utilizando modelos de tuberculose em camundongos, os autores constataram que na ausência do receptor para TNF- α , a formação do granuloma ocorreu de forma desorganizada e com poucos macrófagos epitelióides ativados. Os autores concluíram que essa citocina afeta a migração celular para o local da lesão e exerce influência na expressão de adesão molecular, o que afeta a formação funcional de granulomas no tecido infectado. Entretanto os autores não explicaram os mecanismos pelos quais o TNF- α promove a formação e manutenção do granuloma.

Quanto ao efeito inflamatório deletério dessa citocina, estudo realizado por BEKKER et al. (2000) utilizando BCG recombinante, indicou que elevados níveis de TNF- α causam inflamação destrutiva. Entretanto, experimentos realizados em camundongos mostram que a presença do TNF- α era necessário para limitar a enfermidade no pulmão. O exame histológico mostrou que o pulmão dos camundongos TNF- α neutralizados exibiu lesão severa com granulomas desorganizados e infiltração celular difusa. Portanto, essa citocina contribuiu para limitar a resposta patológica.

5.2.3 Interleucina-2 (IL-2)

A interleucina-2 é uma citocina secretada pelas células T auxiliares ativadas. Essa citocina modula a proliferação de células T auxiliares, T citotóxicas, células B ativadas e NK (SAPAROV et al., 1999), e exerce o papel de fator de crescimento para célula T, o que implica numa estimulação agonista da resposta imune. A manutenção da tolerância periférica pela sobrevivência e função reguladora das células T CD25⁺CD4⁺ também é função desta citocina (FEHERVARI et al., 2006).

Na resposta à tuberculose bovina, a IL-2 exerce uma importante função. Segundo estudos realizados por ALDWELL et al. (1997) demonstrou-se que essa citocina é secretada em bovinos experimentalmente infectados. YOUNG et al. (2002) demonstraram que a sua secreção biologicamente ativada por BCG recombinante aumentou a sua capacidade em induzir e manter resposta imune do tipo 1 em camundongos BALB/c.

5.2.4 Interleucina-4 (IL-4)

Diferentes tipos de células podem secretar IL-4, tais como: células T, eosinófilos, basófilos, NK e células apresentadoras de antígenos. Tem-se demonstrado que a IL-4 está envolvida no direcionamento da resposta Th2 (MIETHKE et al., 1988). Na tuberculose, há possibilidade dessa citocina ter função reguladora ou anti-inflamatória, juntamente com a IL-10 e TGF- β . Na infecção de bovinos com *M. bovis*, há aumento dos níveis de IFN- γ e de IL-4 (SEDDON & MASON, 1999). Existe uma correlação positiva quanto a extensão da lesão pulmonar e a produção de IL-4 pelas PBMC estimuladas com PPD (WEDLOCK et al., 2003).

5.2.5 Interleucina-12 (IL-12)

Acredita-se que a IL-12 tenha um importante papel na imunidade mediada por células. A citocina age principalmente em infecções intracelulares primárias pela ação sobre as células T e NK, direcionando a resposta imune Th1, por meio da produção de IFN- γ (SANO et al., 1999).

XING & SANTOSUOSSO (2000) avaliaram a função da IL-12, em um modelo de infecção celular *in vitro*, na sua capacidade de induzir TNF- α e NO pelos macrófagos. Segundo os autores a IL-12 sozinha induz pouca secreção de TNF- α e NO. Entretanto, a IL-12 quando associada à micobactéria causa a indução de um aumento sinérgico da liberação de TNF e NO. Portanto, a IL-12 pode ativar macrófagos durante a infecção intracelular.

5.2.6 Macrófagos

A função do macrófago na tuberculose é complexa, pois, ao mesmo tempo em que essas células são as preferidas pelas micobactérias

intracelulares, eles também são as células efetoras no controle e destruição desses patógenos (POLLOCK & NEILL, 2002).

M. bovis pode crescer relativamente livre dentro do macrófago bovino (ALDWELL et al., 1996; LIÉBANA et al., 2000). Especialmente em tuberculose humana, consideram-se também que os bacilos são eliminados por meio de uma resposta inata, ou seja, resposta que envolve mecanismos como pH do lisossomo, hidrolases lisossomial, peptídeos bactericidas e superóxido dos macrófagos (RUSSEL, 1999).

Segundo ARMSTRONG & HART (1975), o vacúolo fagocítico contendo micobactéria metabolicamente ativa escapa da fusão com o lisossomo, sendo essa característica um mecanismo de evasão e sobrevivência desse organismo. Os autores acrescentam ainda que a interação macrófago-micobactéria define os eventos subseqüentes da resposta ao *M. bovis*.

As células mononucleares produzem óxido nítrico (NO), uma molécula efetora do sistema imune inato, que é um dos componentes de defesa contra a tuberculose, inibindo a replicação do bacilo *Mycobacterium sp.* (MacMICKING et al., 1997; NATHAN, 1992; NATHAN & SHILOH, 2000). O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). O estímulo da produção de NO por macrófagos e subseqüente geração de nitrogênio reativo são mecanismos potentes para a morte micobacteriana (DENIS, 1991; FLESCHE et al., 1991; CHAN et al., 1995; MacMICKING et al., 1997; HIBBS, 1988).

Após os mecanismos efetores da resposta imune inata, *M. bovis* torna-se estável dentro do macrófago, produzem e secretam antígenos, os quais podem ser apresentados às células T.

5.2.7 Natural Killer

Apesar do papel fundamental dos macrófagos, outras células, tais como as *natural killer* e neutrófilos, podem estar envolvidas na resposta imune, principalmente na fase inicial da infecção por *M. bovis* (POLLOCK & NEILL, 2002).

A célula NK é um tipo de linfócito, grande e granular do sistema imune inato. Essas células estão envolvidas na resposta inicial a uma variedade de patógenos intracelulares, produzindo IFN- γ , bem como, lisando células alvo específicas, na ausência do antígeno (HAMERMAN et al., 2005).

Essas células podem produzir IFN- γ e lisar células alvos infectadas com micobactéria (YONEDA & ELLNER, 1998; JUNQUEIRA KIPNIS et al., 2004). Entretanto, são escassos os conhecimentos acerca do envolvimento dessas células na tuberculose bovina. Estudos recentes realizados por ENDSLEY et al. (2006) demonstraram que as células CD3⁻CD8⁻CD11b⁻ do sangue periférico de bovinos tiveram a atividade celular NK. Além disso, quando as células NK purificadas de bovinos são ativadas pela IL-12 e cultivadas com macrófagos autólogos, infectados com BCG, a replicação bacteriana foi reduzida.

DENIS et al. (2006) estudaram o impacto das células NK sobre a resistência da tuberculose bovina. Segundo os autores, a habilidade de NK em reduzir o crescimento bacteriano é independente da liberação de IFN- γ . Os autores observaram também que a NK aumenta a produção de interleucina-12 e de óxido nítrico pelos macrófagos infectados com *M. bovis*. Outro aspecto relevante que os autores constataram foi quanto à dependência do contato direto entre NK e macrófagos infectados na redução do crescimento micobacteriano.

6 Formação de granulomas

A resposta imune mediada por células na tuberculose bovina desencadeia a formação de granuloma, que é considerado um indicativo de tuberculose (WANGOO et al., 2005).

O mecanismo que desencadeia a formação do granuloma ocorre da seguinte forma: na resposta imune ao *M. bovis*, após à exposição ao antígeno, o TNF- α pré-estocado, liberado pelos mastócitos, recruta neutrófilos e monócitos circulantes. Ao mesmo tempo, o IFN- γ produzido pela NK e T $\gamma\delta$, ativam macrófagos e células dendríticas. Essas células liberam quimiocinas e mais TNF, os quais alteram a microcirculação local e facilitam o tráfego celular para o tecido. Após um período ainda não determinado as células dendríticas

carregadas com antígenos migram para o linfonodo iniciando a resposta linfocítica. Essas células dendríticas produzem interleucina-12 (IL-12) e apresentam o antígeno para as células TCD4⁺ virgens. Sobre a influência da IL-12 as TCD4⁺ virgens diferenciam-se em Th1. Estas por sua vez, secretam IL-2, que leva a expansão clonal da célula Th1 antígeno específica. Cerca de 10 a 20 dias após a exposição ao antígeno do *M. bovis* as células TCD4⁺ ativadas vão para o local onde ocorreu a alteração da microcirculação. Caso a fonte do antígeno não tenha sido erradicada, a inflamação persiste. A interação entre TH1CD4⁺ e macrófagos ativados leva à produção de IFN- γ e TNF que resulta na maturação de mais macrófagos, formando uma lesão endurecida e tumefeita, o granuloma ou tubérculo (WANGOO et al., 2005).

O influxo de monócito/macrófago e células T está associado ao mecanismo de morte ou inibição da micobactéria. Em muitos casos a progressão da doença é retida neste estágio, no entanto, o bacilo presente no tubérculo pode não ser completamente eliminado (STEAD, 1967; VAN CREVEL et al., 2002).

Quando a formação desse granuloma progride, o seu centro torna-se necrótico, devido à falta de irrigação sanguínea e diminuição da oxigenação. Esse processo é classificado como hipersensibilidade do tipo tardia, sendo associado ao início efetivo no controle do crescimento da micobactéria (DANNENBERG, 1991).

PALMER et al. (1999) analisaram as células presentes nos granulomas de bovinos experimentalmente infectados por *M. bovis* e observaram um agregado de macrófagos com poucos neutrófilos, quatro semanas após a inoculação. Decorridas seis a oito semanas, encontrou-se necrose da área central do granuloma, presença de fibrose, numerosos macrófagos, plasmócitos, células gigantes multinucleadas e neutrófilos. CHAVEZ et al. (2001) encontraram elevado nível da expressão da proteína NRAMP1, que está relacionada com a explosão oxidativa dos fagócitos, além da presença de macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas no granuloma de bovinos infectados por *M. bovis*.

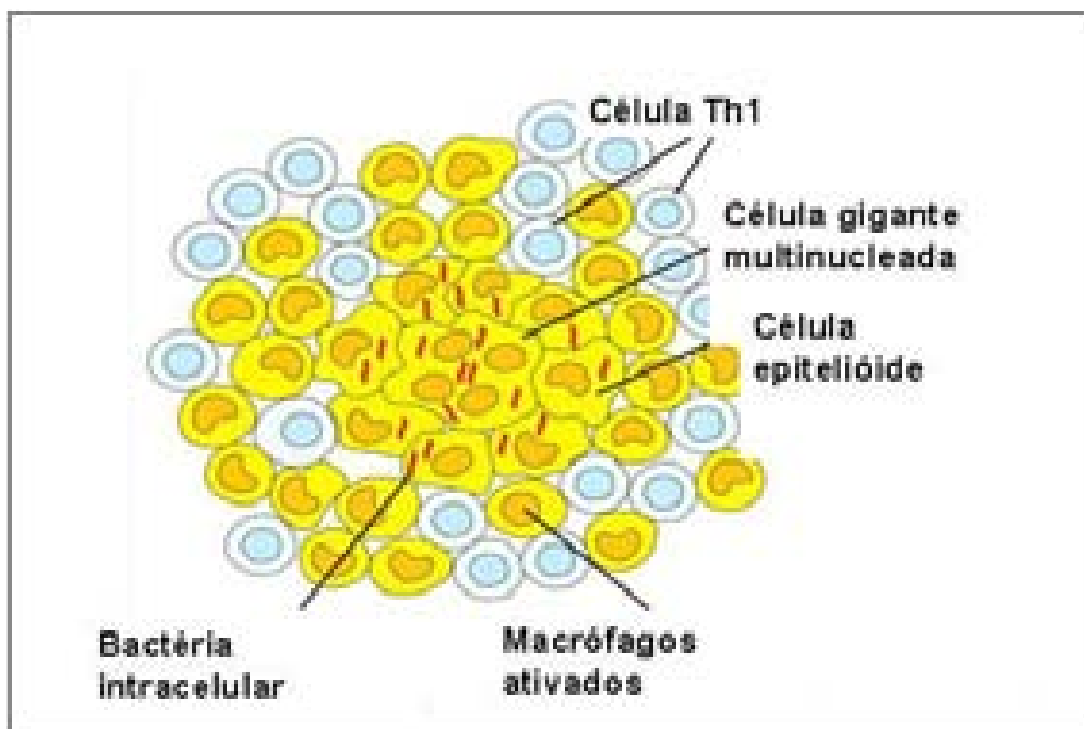


Figura 2 - Principais tipos celulares que formam o granuloma da tuberculose.

Fonte: Adaptado de GOLDSBY et al. (2000)

7 Principais antígenos de *Mycobacterium bovis* reconhecidos na resposta imune

A purificação e caracterização de proteínas antigênicas são essenciais para a compreensão dos mecanismos patogênicos e a resposta imune contra a *M. bovis* (ALITO et al., 2003).

O BCG foi obtido a partir de uma cepa patogênica de *Mycobacterium bovis*, após 230 passagens seriadas em laboratório. Devido à baixa virulência dessa cepa, tem-se utilizado por longo período como vacina contra a tuberculose em humanos (DOHERTY & ANDERSEN, 2002; SKEIKY & SADOFF, 2006) e experimentalmente em animais (BUDDLE et al., 1995).

As proteínas do complexo 85 são produzidas por *M. tuberculosis* em abundância. Tem sido demonstrado que 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. Esta síntese deve-se a sua atividade micolil transferase. De

modo igual, demonstrou-se que quando os monócitos humanos são infectados por *M. tuberculosis*, estas micobactérias secretam o complexo 85, isto poderia ser vantajoso para desenvolver uma vacina, visto que a liberação destas proteínas é de suma importância para o processamento intracelular deste patógeno via MHCII (WHO, 2004; HAUEBNER, 1994; VORDERMEIER et al., 2006; SABLE et al., 2007). Em bovinos esse antígeno recombinante tem sido estudado com o propósito de aplicação no diagnóstico (LILENBAUM et al., 2001).

O MPT-51 (Rv3803c) é um antígeno recombinante de 27 KDa codificado na região FbpC1 adjacente ao gene FbpA do *M. tuberculosis* também denominado como Ag85 D ou MPB 51 (NAGAI et al., 1991; RAMBUKKANA et al., 1993). Apesar de possuir 40% de homologia ao complexo Ag 85, o antígeno MPT-51 não possui atividade micolil transferase (RINKE de WIT et al., 1993; WILSON et al., 2003). O MPT51 é um antígeno protéico, também 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). Ele se liga à fibronectina podendo estar envolvido na virulência do bacilo (KITAURA et al., 2000).

Outros antígenos protéicos de *M. bovis* (12, 19, 22a, 22b, 24, 25, 30, 32, 39 e 70 kDa) foram avaliados quanto à capacidade de estimular a resposta imune celular, por meio da proliferação celular e secreção de IFN- γ . Observando esta resposta nos bovinos infectados por 36 meses, notou-se que todos os antígenos foram reconhecidos pela resposta imune celular, mas a magnitude dessa resposta variou entre os animais (FIFIS et al., 1994).

Algumas proteínas como ESAT-6, CFP10, 85B, MPB70 e novos antígenos, tais como o TPX e TRB-B, foram obtidas através de cromatografia de troca iônica e identificadas por meio de eletroforese em gel bidimensional, sendo considerados antígenos dominantes do *M. bovis*, pois foram reconhecidas pelo sistema imune celular dos bovinos. As proteínas de baixo peso molecular como a ESAT-6 e CFP10 desempenham importante papel na resposta imune celular. As frações protéicas com elevada atividade linfoproliferativa podem ser caracterizadas e associadas tanto a antígenos já identificados quanto a novos antígenos protéicos presentes no *M. bovis* (ALITO et al., 2003).

RHODES et al. (2000) estudaram a cinética da célula T em resposta a um painel de antígenos micobacterianos do *M. bovis* (PPD-M, PPD-A, ESAT-6, Ag85, 38kD, MPB64, MPB70, MPB83, hsp16.1, hsp65, e hsp70). Os autores observaram aumento da proliferação de linfócitos antígeno-específico, bem como aumento na secreção de IFN- γ e IL-2. A resposta ao PPD-M e ESAT-6 foi mais expressiva durante o período estudado, entretanto a resposta a todos os outros antígenos foi mais variável, sugerindo que o coquetel de antígenos é mais aplicável do que um antígeno individual para o imunodiagnóstico.

Com o objetivo de diferenciar bovinos infectados por *M. bovis* e os vacinados com BCG, BUDDLE et al. (1999) avaliaram a secreção de IFN- γ , estimulado pelas proteínas antigênicas MPB59, MPB64, MPB70 e ESAT-6. A resposta ao MPB59, MPB64 e MPB70 foi significativamente maior em ambos os grupos, portanto esses antígenos não são capazes de discriminar animais vacinados de tuberculosos. Dentre todos os antígenos testados, apenas o ESAT-6 diferenciou BCG vacinados dos bovinos infectados com *M. bovis*. POLLOCK et al. (2003) realizou o teste intradérmico bovino para diagnóstico de tuberculose, utilizando o ESAT-6. Esse antígeno foi reconhecido pelas células T e estimulou alta produção de IFN- γ . Apesar da resposta do ESAT-6 ao teste intradérmico ter sido detectada tardiamente (96 h), esse antígeno demonstrou sensibilidade de 86% e especificidade de 100%, sendo, portanto, um antígeno em potencial para diagnóstico *in vivo* para tuberculose bovina.

8 Métodos de diagnóstico para tuberculose bovina

O principal método de diagnóstico nos animais é baseado na reação de hipersensibilidade, por meio do derivado de proteína purificada (PPD), cuja reação é avaliada por meio de teste de tuberculina intradérmico. Apesar desse teste ser adotado em muitos países como método padrão na identificação da tuberculose animal, muitos estudos têm apontado falhas, pois são relatados tanto resultados falso negativos como falso positivos. Portanto, novos testes que permitam discriminar os animais infectados são necessários.

Em alguns países que implementaram o programa de controle e erradicação da tuberculose bovina, os animais foram classificados em

reagentes ou não reagentes, utilizando algumas das variantes do teste de tuberculina intradérmica (ANON, 2004). Esse teste é preconizado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) para o comércio internacional de bovinos.

Segundo RUA-DOMENECH et al. (2006), devido a alguns fatores como a dinâmica da transmissão da tuberculose entre os animais, o tamanho das lesões que inicialmente são microscópicas e o tempo que o animal leva para montar uma resposta imune detectável, nenhum método é totalmente eficaz para detectar todos os animais infectados. Conseqüentemente, tem-se desenvolvido testes com fins de diagnósticos, tais como a dosagem do IFN- γ produzido especificamente à antígenos micobacterianos, avaliação da proliferação de linfócitos e polarização fluorescente. Também a detecção do *M. bovis* nas lesões dos animais abatidos facilitariam a confirmação do diagnóstico obtido pelo TTI (COUSINS & FLORESSON, 2005).

Existem diversas técnicas de diagnóstico aplicadas para detectar a tuberculose. O diagnóstico pré-clínico pode ser realizado por meio de uso de testes da imunidade celular e humoral, além de tecnologias moleculares (RUA-DOMENECH, 2006). Para avaliação do melhor método a ser aplicado na detecção da tuberculose bovina, WATRELOT-VIRIEUX et al (2006) utilizaram três métodos: a coloração Ziehl-Neelsen, fluorescência com auramina e imunohistoquímica, usando anticorpo policlonal anti-*M. bovis*. A técnica de imunohistoquímica foi mais sensível ao detectar maior número de bovinos positivos.

Apesar de existir diversas pesquisas acerca de vários métodos de diagnóstico da tuberculose, o melhor método a ser aplicado dependerá de vários fatores, dentre eles o tipo de tuberculose, a fase da enfermidade, além da situação endêmica de cada região. No quadro 1 são apresentados algumas espécies animais que são infectadas por tuberculose e os testes mais usualmente aplicados.

QUADRO 1- Testes para diagnóstico de tuberculose causada por *M. bovis* em algumas espécies animais e no homem.

Espécie animal	Teste	Sensibilidade	Especificidade
Bovinos	Teste simples de tuberculina Intradérmico	68%-95%	96%-99%
	Teste comparativo de tuberculina intradérmico	Não estimado	>99%
	IFN- γ BOVIGAM	76%-93,6%	92,2%-98,1%
	Exame pós-morte	Não estimado	Não estimado
	Cultura bacteriológica	Não estimado	Não estimado
	ELISA (Ag: ESAT-6, MTSA-10, MPTS1, MPT63, MPB59, MPB64, MPB70, MPB83)	57,1%	Não estimado
	ELISA (Ag: ESAT-6, MPB70)	98,6% ESAT-6 96,8% MPB70	98,5% ESAT-6 90,1% MPB70
	Imunocromatografia (Ag MPB70)	83%	99,4%
	Polarização fluorescente	79%	99,8%
Búfalos	Comparativo com tuberculina intradérmico na prega caudal	Não estimado	Não estimado
	Tuberculina intradérmico	95,3%	97,7%
	IFN- γ BOVIGAM	Não estimado	Não estimado
Camelos	Simple com tuberculina intradérmico	100%	100%
	Comparativo com tuberculina intradérmico	87,5%	100%
	ELISA (PPD bovino e aviário)	100%	100%
Cães	Teste de tuberculina simples	Não estimado	Não estimado
Elefantes	Teste de tuberculina intradérmico	Pouca	Pouca
	Imunoblot (Ag de sonicado de <i>M. bovis</i>)	Não estimado	Não estimado
	IFN- γ	Não estimado	Não estimado
	ELISA (multiantígenos)	Não estimado	Não estimado
Caprinos	Teste simples de tuberculina intradérmico	100%	100%
	Teste comparativo de tuberculina intradérmico	83,7%	100%
	IFN- γ	Não estimado	Não estimado
	ELISA (Ag de PPD bovino)	54,9%	88%
Humanos	Teste de tuberculina intradérmico	75%-90%	70%-100%
	IFN- γ (Quantiferon)	82%-89%	Não estimado
Suínos	Teste comparativo de tuberculina intradérmico	100%	100%
	IFN- γ	Não estimado	Não estimado

Fonte: Adaptado de COUSINS & FLORISSON (2005)

8.1 Identificação do agente

Para a identificação do *M. bovis* são necessários cuidados específicos com as amostras. No transporte dos espécimes clínicos para o laboratório deve-se tomar algumas precauções, tais como uso de recipientes plásticos selados, para prevenir o vazamento desse material para o meio exterior, preservar o material e evitar contaminação. A associação de transporte aéreo internacional possui um regulamento para embarcação de espécimes de caráter zoonótico. Os espécimes clínicos devem ser refrigerados ou congelados para retardar o crescimento do *Mycobacterium* sp. Em condições onde o uso da refrigeração não for possível, pode-se adicionar o ácido bórico, na concentração de 0,5%, como um agente bacteriostático, entretanto, essa substância garante a preservação por períodos limitados de apenas uma semana (OIE, 2004).

A presença do *Mycobacterium* sp. em espécimes clínicos e pós-morte dos animais pode ser demonstrada por meio de esfregaços e posterior coloração, cultivo e isolamento do microorganismo. Para o cultivo desse bacilo, deve-se utilizar todo material devidamente esterilizado, pois o uso de recipientes contendo micobactéria ambiental pode resultar na falha no processo de identificação, devido ao rápido crescimento das micobactérias ambientais (CHIODINI et al., 1984).

Uma diferenciação importante quanto ao crescimento do *M. bovis* e do *M. tuberculosis* é quanto à restrição do glicerol, cujo componente é necessário para o *M. tuberculosis*, mas pode retardar o crescimento do *M. bovis*. Portanto no preparo do meio para esta micobactéria deve-se substituir o glicerol por piruvato (MOTA et al., 2001).

Os bacilos *M. bovis* podem ser demonstrados microscopicamente por meio de esfregaços diretos de espécimes clínicos e preparados de materiais teciduais. Quanto à coloração pode-se aplicar a clássica Ziehl-Neelsen e o ácido fluorescente além da técnica de imunoperoxidase que tem dado resultados satisfatórios (SELVAKUMAR et al., 2006).

O período médio para o crescimento do *M. bovis* é de três a seis semanas. As características do crescimento e a morfologia colonial podem

demonstrar um diagnóstico presuntivo, entretanto a confirmação é obtida por meio de avaliação bioquímica (MILLER et al., 1997).

8.1.2 Diagnóstico molecular

Atualmente, as técnicas moleculares permitem a identificação das espécies de micobactérias nas amostras cujos métodos tradicionais de identificação foram negativos (BARRÓN et al., 2006).

Dentre as técnicas da biologia molecular encontra-se: a amplificação e detecção de segmentos genéticos espécie-específicos pelo PCR, o sequenciamento genético por PCR, pela técnica de microarranjos do ácido desoxiribonucleico (DNA), técnica da PCR aplicada para a detecção de proteína hsp65 (AGRANOFF et al., 2006).

Um teste já comercializado, mas ainda sob observação é o TB PNA FISH, que é baseado na utilização de sondas de peptídeos do ácido nucléico, que devido às suas características hidrofóbicas, penetram a parede micobacteriana e podem se ligar a regiões selecionadas do 16S rRNA, permitindo a diferenciação entre *M. tuberculosis* e outras micobactérias (DALCOMO et al., 2004).

A técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta performance) se baseia no fato de que cada espécie de micobactéria sintetiza um único padrão de ácidos micólicos na composição de sua parede celular (THIBERT & LAPIERRE (1993). Entretanto, essa técnica não diferencia *M. tuberculosis* de *M. bovis*, apesar de diferenciar *M. bovis* BCG do complexo *M. tuberculosis* (FLOYD et al., 1992).

8.1.2.1 Reconhecimento de ácido nucléico

A reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido amplamente empregada para a detecção do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicos, especialmente escarro, em pacientes humanos e mais recentemente tem sido aplicada também no diagnóstico da tuberculose nos animais (ARAÚJO et al., 2005). A técnica se baseia na habilidade de replicar ou amplificar DNA sem proliferação biológica do organismo portador de tal

genoma. A reação da PCR pode ser realizada através da técnica caseira ou através de *kits* comerciais (KRITSKI et al., 2005).

Já existe um número considerável de *kits* que podem ser utilizados para detecção de bactérias do complexo *M tuberculosis* a fresco e em tecidos fixados. Vários oligonucleotídeos indicadores têm sido usados, incluindo os que amplificam seqüências de rRNA 16S-23S, seqüência de inserção IS6110 e IS1081, genes codificadores de proteínas específicas para o complexo de *M tuberculosis*, tal como MPB70, hsp65 e antígeno de 38 kDa. Os produtos amplificados têm sido analisados por meio de hibridização com sonda ou com eletroforese em gel de agarose (NOREDHOEK et al., 1996).

Resultados falso-positivo e falso-negativo, particularmente em espécimes contendo baixo número de bacilos, têm reduzido a acurácia do PCR. Esse fato pode ser atribuído ao baixo número de cópias da seqüência no genoma dos bacilos, combinado ainda pela baixa quantidade destes bacilos. A variabilidade tem sido também atribuída ao método de descontaminação, o procedimento da extração de DNA, técnicas para a eliminação de enzimas inibidoras da polimerase, controle interno e externo e procedimentos para a prevenção de contaminações cruzadas (MILLER et al.2002; MILLER et al., 1997).

Segundo ESPINOSA et al. (1998), as técnicas de análises de DNA promovem uma avaliação mais rápida e com melhor acurácia quando comparados aos métodos bioquímicos, no processo de diferenciação das micobacterioses. No entanto, ZANINI et al. (1998) afirmaram existir algumas dificuldades na extração de DNA cromossômico, que seriam responsáveis pelos entraves observados na aplicação dos métodos moleculares para a detecção de *Mycobacterium sp.*, ressaltando a excessiva resistência da parede celular das micobactérias à lise ou rompimentos por agentes externos.

CEDENO et al. (2005) extraíram o DNA de 60 amostras de muco nasal de bovinos, coletaram de três diferentes propriedades no Panamá, localizadas em uma área endêmica para *M. bovis*. Os autores encontraram 65% das amostras positivas para a micobactéria por meio da PCR.

8.1.3 Diagnósticos imunológicos

8.1.3.1 Reação de Hipersensibilidade

O extrato de glicerol de cultura líquida pura de bacilos foi descoberto por Robert Koch em 1890. Sofreu refinamento ao longo de vários anos, sendo desenvolvido um derivado de proteína purificada (PPD). O organismo é cultivado em meio líquido sintético, tratado pelo calor, filtrado, concentrado por precipitação, lavado e posteriormente redissolvido dentro de uma preparação estéril, livre de micobactéria (MONAGHAN et al., 1994).

A tuberculina bovina é similar a tuberculina aviária e humana, as quais são obtidas de bacilos de *M. avium* supesp. *Avium* e *M. bovis* AN5, respectivamente. Quando a tuberculina bovina é injetada na pele do animal não sensibilizado não ocorre resposta inflamatória no local da aplicação. Entretanto, se a tuberculina é injetada em animal cujo sistema imune já foi sensibilizado por meio de uma infecção por micobactéria, ou pela exposição a outros patógenos micobacterianos, haverá a formação de uma reação inflamatória no local, onde nota-se maior intensidade entre 48-72 horas após a injeção (LAGE et al., 2006; POLLOCK et al., 2003). Essa reação de hipersensibilidade tardia é mediada pela população de células T sensibilizadas (THORNS & MORRIS, 1983).

O teste de tuberculina é realizado por meio de injeção intradérmica de PPD de *M. bovis* e a subsequente detecção de reação de hipersensibilidade tardia (ANON, 2004). Esse tipo de reação é o método de escolha para os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, em vários países (MONAGHAN et al., 1994). Há basicamente duas formas de aplicação do teste intradérmico nos animais: o teste intradérmico simples ou único e o teste de tuberculina comparado, que realiza a comparação entre a reação à tuberculina aviária e a reação à tuberculina bovina (RUA-DOMENECH et al., 2006).

O teste intradérmico simples pode ser aplicado na região cervical média ou na prega caudal (ANON, 2004). O princípio do teste intradérmico simples para bovinos é similar ao teste cutâneo para diagnóstico de tuberculose nos humanos (SNIDER, 1982).

O teste comparativo intradérmico requer mais tempo para a aplicação do que o simples, pois ele se aplica injeção simultânea de tuberculina bovina e aviária, uma ao lado da outra, na região cervical. A interpretação desse teste é baseada na observação da maior resposta à tuberculina bovina, nos animais infectados pelo *M. bovis*, por outro lado, animais infectados com outras micobactérias desenvolvem maior reação a tuberculina aviária (POLLOCK et al., 2003). No Brasil, a positividade do teste é estabelecida quando a diferença do aumento da dobra da pele provocada pela inoculação da tuberculina PPD bovina e da tuberculina PPD aviária, após 72 h da aplicação é maior ou igual a 4 mm (LAGE et al., 2006).

O teste de tuberculina é o único teste para a tuberculose bovina prescrito pela OIE, além disso, ele é utilizado em diferentes países. Por exemplo, na Austrália utiliza-se com maior frequência o teste na prega caudal usando dose elevada de tuberculina, ao passo que o teste de tuberculina comparativo raramente é usado. Situação contrária ocorre em países europeus, onde o simples teste de tuberculina usando PPD bovino raramente é usado e na República da Irlanda e Grã Bretanha o teste de tuberculina comparativo, aplicado no pescoço do animal é usado rotineiramente. Portanto, cada país estabelece seu próprio protocolo para uso e interpretação do teste de tuberculina, baseado nas circunstâncias locais e requerimento de programas.

Segundo WATRELOT-VIRIEUX et al. (2006), a cinética de desenvolvimento da reação de hipersensibilidade tardia em bovinos infectados pode ser identificada a partir de três semanas pós-infecção, nesse período, poderá ser correlacionada com a detecção da resposta do IFN- γ antígeno específico.

SNIDER (1982) cita alguns fatores que podem influenciar em resultados falso-negativos e falso-positivos no teste de tuberculina em bovinos, dentre esses fatores destacam-se: os relacionados ao próprio animal, tais como a aplicação do teste logo após um prévio teste de tuberculina, aplicação do teste logo após a infecção pela tuberculose, anergia, co-infecção com micobacterioses ambientais, vacinação contra *M. avium* sp., *Paratuberculosis*, infecção concomitante por vírus, stress de transporte e nutricional; os advindos da tuberculina utilizada, sobretudo quanto ao uso de produtos sub-potentes e

finalmente aqueles relacionados ao método de administração, principalmente quanto aos erros devido à inexperiência e falta de atenção do aplicador, dificuldades durante a aplicação e pobre qualidade do equipamento usado para a aplicação da tuberculina nos animais.

Em algumas situações, os animais são reagentes, porém não se encontram lesões visíveis. RUA-DOMENECH et al. (2006) relataram que este fenômeno pode ocorrer quando os animais encontram-se nos estágios iniciais da infecção pelo *M. bovis* ou quando os animais foram infectados pelo *M. bovis*, porém sem manifestação da doença, principalmente quando os bacilos estão latentes; ou até mesmo animais não infectados expostos a antígenos micobacterianos ambientais que induzem a reação cruzada com a tuberculina bovina ou a outros antígenos de *M. bovis*.

Outro método de avaliação da reação de hipersensibilidade tardia nos animais portadores de tuberculose é o uso do antígeno ESAT-6. Esse antígeno oferece a vantagem de possuir distribuição limitada entre as espécies de micobactéria, conseqüentemente, possui pouca ou nenhuma reação cruzada (POLLOCK & ANDERSEN, 1997). POLLOCK et al. (2003) realizaram o teste intradérmico bovino para diagnóstico de tuberculose, utilizando o ESAT-6. Apesar da resposta do ESAT-6 ao teste intradérmico ter sido detectada tardiamente (96 h) e necessitar de dose maior, comparada ao PPD, esse antígeno demonstrou sensibilidade de 86% e especificidade de 100%, sendo, portanto um antígeno em potencial para diagnóstico *in vivo* para tuberculose bovina. AAGAARD et al. (2006) testaram antígenos como o ESAT-6, CFP10, PE13, PE5, MPB70, TB10.4 e TB27.4 com potencial de diagnóstico nos rebanhos de bovinos da Irlanda do Norte, México e Argentina. Em todos os países testados, o ESAT-6 e o CFP10 foram superiores no diagnóstico da tuberculose. A maior sensibilidade do teste intradérmico do grupo reagente, combinada com a maior especificidade do grupo livre de tuberculose, indicou que 85 % dos animais infectados e não infectados podem ser diagnosticados, baseado na resposta a estes dois antígenos.

8.1.3.2 Testes laboratoriais baseados nos componentes do sangue (células, moléculas e soro)

a) Proliferação de linfócitos e produção de citocinas

Devido à função desempenhada por essas subpopulações de linfócitos durante a infecção de tuberculose, as mesmas podem ser usadas como parâmetro de avaliação da resposta imune a essa enfermidade e conseqüentemente como um meio de diagnóstico, nos animais e no homem. Dois aspectos são importantes na responsividade das células T na infecção de tuberculose. O primeiro seria a descoberta do antígeno dominante, ou seja, o que é capaz de ativar maior quantidade de células T e discriminação dentre as populações desses linfócitos (POLLOCK et al., 2001). Pesquisas tem apontados alguns antígenos presentes no *M. bovis*, e que são capazes de causar maior responsividade nos linfócitos T, sendo, portanto moléculas candidatas a diagnóstico, tais como o MPB70, MPB64 (LIGHTBODY et al., 1998), ESAT-6 e CFP10 (FIFIS et al., 1994).

Quando um animal é infectado por *M. bovis*, as células T respondem aos antígenos micobacterianos, sob expansão clonal levando ao desenvolvimento de células de memória (POLLOCK et al., 2001). Segundo LIÉBANA et al., (1999) as células TCD4⁺ e TCD8⁺ de bovinos infectados por *M. bovis* proliferam-se significativamente na presença de antígenos micobacterianos.

O IFN- γ é uma citocina predominantemente liberada pelas células T após estimulação antigênica. Além disso, essa molécula está envolvida na imunidade a infecções micobacterianas (POLLOCK et al., 2005; BAROJA & CEUPPENS, 1987). Essas características do IFN- γ fizeram com que WOOD et al. (1990) avaliassem experimentalmente o IFN- γ , por meio da incubação do sangue fresco com PPD de *M. bovis*. Assim como o teste intradérmico, o princípio do teste é a detecção da resposta imune mediada por células do hospedeiro contra a infecção causada pelo *M. bovis* (POLLOCK et al., (2005). Outra característica similar de ambos os testes, é que comparam a resposta imune celular pela estimulação com antígenos de *M. bovis* e *M. avium*. A partir

de uma a quatro semanas de infecção, as células T do sangue periférico de bovinos liberam *in vitro* quantidades mensuráveis de IFN- γ , quando estimulado por tuberculina bovina ou antígenos similar ao *M. bovis*. Caso o animal esteja infectado por *M. avium* ou outra micobactéria ambiental, a produção dessa citocina será maior quando for incubada com a tuberculina aviária (WOOD & JONES, 2001).

O teste do IFN- γ é realizado *in vitro* em dois estágios. No primeiro o sangue heparinizado é distribuído em duplicatas. As amostras são incubadas por 28h a 37°C na presença de antígenos, principalmente PPD bovino ou o aviário, além do controle negativo. Após 16 a 24 horas de incubação, retira-se o sobrenadante. No segundo estágio, quantifica-se a produção do IFN- γ por meio de ELISA de captura, utilizando um kit comercial (RUA-DOMENECH et al., 2006). Este teste utiliza como antígenos tuberculina bovina e aviária. O kit é patentado com o nome comercial de BOVIGAM[®]. Tem-se utilizado *kit* similar para o diagnóstico de tuberculose em cabras, ovelhas, búfalo africano e teoricamente pode ser aplicado em toda família *bovidae*. O teste do BOVIGAM[®] não é diretamente aplicado a outros mamíferos, mas o princípio deste teste pode ser adaptado para o diagnóstico da tuberculose em humanos (QuantIFERON[®] -TB, Cellestis Ltd, Austrália) (CONNELL et al., 2006; BRITTON et al., 2005).

O estudo em larga escala da avaliação do IFN- γ foi conduzido na Austrália por WOOD et al. (1991). Os autores testaram 6000 bovinos e búfalos de rebanhos infectados por *M. bovis* e observaram 125 animais positivos para *M. bovis* na cultura de materiais de biópsia. Destes animais 93,6% foram também positivos quando analisados pela técnica do IFN- γ , comparado com 65,6% pelo teste intradérmico de tuberculina. Os resultados apresentaram sensibilidade de 95,2% e especificidade de 96,3%, provando que essa técnica é mais sensível do que o teste de tuberculina intradérmico para o diagnóstico da tuberculose bovina.

A avaliação do IFN- γ tem sido testada mundialmente, a partir dos estudos realizados na Austrália. Na Irlanda 87,7% dos animais com culturas positivas para *M. bovis* tiveram resultados positivos para o IFN- γ (MONAGHAN et al., 1997). Nos Estados Unidos WHIIPPLE et al. (1995) relataram que a

sensibilidade do teste intradérmico é de 80,4-84,4% e do IFN- γ variou entre 55,4-94,7%. Na Itália, BUONAVOGLIA et al. (1995) demonstraram que a avaliação da citocina é mais sensível do que o teste intradérmico nos animais com lesão sugestiva de tuberculose. Em estudo subsequente realizado por DONDO et al. (1996) relataram que a sensibilidade e especificidade do IFN- γ foi de 96,6% e 98%, respectivamente.

A partir de estudo experimental realizado por BUDDLE et al. (1995) foi concluído que o IFN- γ é capaz de detectar infecção por *M. bovis* 14 dias após a inoculação da micobactéria nos animais. LILENBAUM et al. (1999) observaram que o IFN- γ pode detectar mais precocemente os animais tuberculosos em média 60 a 120 dias do que o teste de tuberculina. Segundo WOOD & JONES (2001) isso deve ser a explicação para o aumento aparente da sensibilidade, comparado com o teste intradérmico e a relativa maior proporção de IFN- γ positivo e intradérmico negativo em animais infectados pelo *M. bovis*.

No Brasil, LILENBAUM et al. (1999) realizaram uma comparação entre o teste intradérmico de tuberculina e a avaliação do IFN- γ de bovinos. Um total de 1632 de animais foram avaliados pelo teste intradérmico cervical. Dentre esses animais 220 foram selecionados por representar grupo de alto risco e testados com o teste de IFN- γ , sendo que 207 apresentaram reação significativa para o teste. Nesse grupo selecionado 126 animais (57,3%) foram reativos ao IFN- γ , e 106 (48,2%) apresentaram reação positiva para tuberculina. SOPP et al. (2006) afirmaram que a avaliação do IFN- γ pode discriminar bovinos vacinados por BCG de infectados por *M. bovis*.

b) Anticorpos

A resposta à tuberculose nos animais no início da infecção é predominantemente celular. Com o progresso da doença, há maior resposta imune humoral (WATERS et al., 2006; POLOCK et al., 2005; WELSH et al., 2005; POLLOCK & NEILL, 2002). Uma das desvantagens do diagnóstico por meio da tuberculina intradérmica nos estágios avançados da doença é que os animais falham em responder, sendo chamados de anérgicos ao TTI. Esses

animais, entretanto, mantêm os bacilos circulando nos rebanhos. Os animais anérgicos podem ser detectados por meio sorológico, mais especificamente pela técnica de ELISA (YEARSLEY et al., 1998).

Os testes para detecção de anticorpos específicos para a tuberculose são semelhantes para os animais e os humanos (FIFIS et al. 1992). Especialmente para bovinos, a inclusão de antígenos soro dominantes como o MPB70 e MPB83 tem aumentado a especificidade, mas não resulta em maior sensibilidade. Estudos realizados por THOM et al. (2004) mostraram que a resposta dos animais anérgicos é maior em relação aos anticorpos específicos do que pelo teste intradérmico. Esse aumento é correlacionado com a severidade da doença, sendo que animais com a doença mais generalizada apresentam maior título de anticorpos (LYASHCHENKO et al., 2004).

WATERS et al. (2006) avaliaram o soro de bovinos infectados por *M. bovis* por sororeatividade a antígenos micobacterianos. A resposta ao MPB83 foi detectada em todos os animais, quatro semanas após a inoculação. Outros antígenos como o ESAT-6, CFP-10, e MPB70 foram menos reconhecidos. A detecção da IgM específica para MPB83 ocorreu antes da IgG.

Os testes para detecção de anticorpos são simples e não onerosos, oferecendo uma alternativa para detectar animais que foram negativos ao TTI e ao IFN- γ . Conseqüentemente, os países em desenvolvimento podem adotar os testes sorológicos nos programas de erradicação da tuberculose como uma alternativa barata para detecção e remoção de animais em estados avançados da doença de seus rebanhos (POLLOCK et al., 2005).

9 Vacinas contra *Mycobacterium tuberculosis*

Considerando a baixa eficácia da BCG na proteção da tuberculose pulmonar em adolescentes e adultos há necessidade de nova vacina contra a tuberculose, especialmente nos países onde a prevalência da enfermidade é elevada.

9.1 Vacinas com microrganismos vivos (BCG, *M.tuberculosis*)

As vacinas compostas de microrganismos vivos são alternativas em potencial, pois induzem resposta imunológica celular e humoral. Além disso, não necessitam de adição de adjuvantes, pois os próprios componentes da bactéria promovem esse papel. No entanto, elas oferecem alguns riscos, como reversão de virulência ou possível indução de patologia mediante situações de imunossupressão (ALPAR et al., 2005).

A vantagem de vacinas atenuadas utilizando *M. tuberculosis* é aumentar a imunogenicidade das mesmas, uma vez que centenas de genes foram perdidos durante as sucessivas passagens, às condições laboratoriais, dos bacilos *M. bovis*-BCG (CAMACHO et al., 1999). A esse exemplo cita-se a região RD1 do *Mycobacterium tuberculosis*, que está associado provavelmente com a produção de proteínas citotóxicas (JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2006).

Muitos estudos têm sido realizados, utilizando cepas atenuadas de *M. tuberculosis*, dentre eles o *M. tuberculosis pho*, construído com uma simples ruptura do gene *pho*. O produto deste gene faz parte de um complexo de proteínas que possibilita ao microrganismo sua sobrevivência a diferentes estímulos externos. A cepa *phoP* mutante demonstra multiplicação reduzida quando cultivada em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos. A mutação não afeta a sobrevivência do bacilo no interior de macrófagos, apesar do gene ser necessário para o crescimento intracelular do *M. tuberculosis* (Peres³⁰). Recentemente, um *M. tuberculosis* mutante com defeito em um lipídeo micobacteriano (*Mtb drrC*) mostrou protetor quando administrado em camundongos (PINTO et al., 2004).

Estudos para modificar o *M. bovis* do BCG ou o *M. tuberculosis* por tecnologia do DNA recombinante a fim de produzir uma nova vacina atenuada contra a tuberculose também foram avaliados (FINE, 2001; HUEBNER et al., 1994). Usando o mesmo raciocínio, uma cepa mutante de SO2 de *M. tuberculosis* foi testada em cobaias apresentando proteção satisfatória ao avaliar a sobrevivência e redução da severidade da doença, comparada à proteção oferecida pelo BCG.

A segurança da BCG é uma preocupação crescente, em função da infecção por HIV. Para prevenir os potentes efeitos adversos da BCG em

indivíduos imunocomprometidos têm sido desenvolvidos auxotrófos que são microrganismos que requerem uma fonte exógena de fatores de crescimento devido a sua incapacidade de sintetizá-los. Os resultados mostram que estas cepas são seguras em camundongos com imunodeficiência severa combinada e demonstram a mesma quantidade de proteção nos camundongos normais susceptíveis à tuberculose, sugerindo que este poderia ser um método mais seguro de vacinação (HUEBNER et al., 1994). DERRICK et al. (2006) trabalhou com *M. tuberculosis* mutante (mc²6030) que possui replicação limitada e testaram em camundongo normal e imunocomprometido. Adicionalmente, ao se realizar a depleção de linfócitos TCD8⁺ bem como de NK1.1 e de TCR $\gamma\delta$ observou-se pouco efeito na proteção induzida pela vacinação, sugerindo que as células duplo negativas foram responsáveis pela proteção induzida pela vacina. Além disso, notou-se que estas células são dependentes de MHC II e são secretoras de INF- γ , porém em menor quantidade do que as TCD8⁺. A atenuação da virulência do bacilo *M. tuberculosis* foi também estudada por HENAO-TAMAYO et al. (2007) retirando a lipoproteína Rv3763 do bacilo da tuberculose. A proteção contra a tuberculose foi similar entre os animais que receberam o *M. tuberculosis* mutante e o BCG bem como a ativação de células CD4 e CD8 que secretam IFN- γ , indicando que apesar da atenuação do microrganismo mutado, foi preservado as suas propriedades vacinogênicas.

9.2 Vacinas de DNA e subunidades

A possibilidade de usar vacinas de DNA é uma alternativa arriscada pois elas são construídas para codificar vários antígenos, os quais são 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 que será expressa. 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), têm sido testadas em modelos animais contra tuberculose.

As vacinas de DNA não somente geram linfócitos Th1 específicos como também TCD8, os quais são considerados importantes na proteção contra tuberculose (LOWRIE et al., 1994; SILVA, 1996; BONATO et al., 1998).

Os antígenos Ag85 - 85A, 85B e 85C – antígeno PstS-1, proteínas de choque térmico hsp65 e 70 e ESAT-6 são os principais candidatos à construção de vacina de DNA contra a tuberculose, (HUYGEN et al., 1996; BONATO et al., 1998). Esses antígenos têm capacidade elevada de induzir altos níveis de resposta imune, mobilizando todo o sistema celular, CD4 - CD8, Th1, Th2, macrófagos, células monocitárias em geral, com produção de citocinas mais atuantes, entre estas, o interferon gama e o fator de necrose tumoral alfa. Camundongos que receberam vacina de DNA demonstraram essa mobilização celular e adquiriram significativa proteção antituberculosa (HUYGEN et al., 1996). PAULA et al. (2007) aperfeiçoou a vacina de DNA, co-encapsulando DNAhsp65 e o adjuvante trealose dimicolato (TDM) em esferas biodegradáveis para que a vacina fosse administrada em uma única dose. Os autores realizaram os testes em camundongos e em cobaias observando boa eficácia e diminuição da patologia pulmonar em ambos os tipos de animais.

As proteínas CFP-10 (Rv3874), GroES (Rv3418c) e complexo 85 são muito usadas como antígenos recombinantes devido à sua elevada capacidade de induzir a ativação de células T. Estes antígenos foram similares ao induzir uma resposta Th1 protetora em camundongos, sugerindo que nenhum deles é imunodominante (HUEBNER, 2004). Também o ESAT-6 (Rv3875) com massa molecular de 6-KDa, (do *inglês early secretory antigenic target 6*) caracterizado por SORENSEN et al. (1995), 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 tem sido muito utilizada (MAHAIRAS et al., 1996; BERTHET et al., 1998). Em animais infectados com *M. tuberculosis*, tratados e reinfetados observou-se uma forte resposta de células T ao ESAT-6, sugerindo que esta proteína também é imunogênica (HUEBNER, 1994; FAN et al., 2006; LI et al., 2006). Este fato foi confirmado quando BRANDT et al. (2004) avaliaram o potencial do ESAT-6 em modelo vacinal, demonstrando 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 não basta ser imunogênica, mas a via de administração de uma vacina é crucial na determinação da proteção.

As proteínas do complexo 85 são produzidas por *M. tuberculosis* em abundância. A importância destas proteínas se deve, provavelmente, ao seu papel na síntese da parede celular e dos ácidos micólicos de micobactérias. De modo igual, demonstrou-se que quando os monócitos humanos são infectados por *M. tuberculosis*, estas micobactérias secretam o complexo 85, isto poderia ser vantajoso para desenvolver uma vacina, visto que a liberação destas proteínas é de suma importância para o processamento intracelular deste patógeno via MHCII (HAUEBNER, 1994; VORDERMEIER et al., 2006). A imunização de camundongos utilizando plasmídeo de DNA contendo o Ag85 induz resposta imune humoral e celular, conferindo significativa proteção, quando desafiados com *M. tuberculosis* e BCG (HUYGEN, 1996).

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

O MPT-51 (Rv3803c) é um antígeno recombinante de 27 KDa codificado na região FbpC1 adjacente ao gene FbpA do *M. tuberculosis*. Essa proteína é também denominada como Ag.85 D ou MPB 51 (NAGAI et al., 1991). Apesar de possuir 40% de homologia ao complexo Ag85 este não possui atividade micolil transferase (RINKE DE WIT et al., 1993) caracterizando-o como uma nova família não catalítica com capacidade de ligar-se a fibronectina (KITAURA et al., 2000). O MPT51 é um antígeno protéico expresso em outras micobactérias como *M. leprae* (RINKE DE WIT et al.,

1993), *M. avium* e *M. bovis* BCG (OHARA et al., 1997). Este antígeno tem se mostrado um bom marcador para diagnóstico de tuberculose (ALMEIDA et al., 2008), principalmente em pacientes co-infectados com HIV (SINGH et al., 2005).

A Mtb 72F foi a primeira vacina recombinante contra TB testada em humanos. Essa proteína é obtida da fusão dos antígenos Mtb39 e Mtb32, e foi testada como subunidades vacinais, resultando em proteção contra cepa virulenta de *M. tuberculosis* em camundongos quanto à produção de IFN- γ e ativação de células TCD8, assim essa subunidade poderia ser aplicada na estratégia de profilaxia-reforço da BCG. (SKEIKY et al., 2004). BRANDT et al. (2004) realizaram estudo com a Mtb72F e observou que houve aumento da resposta imune Th1, entretanto não houve diminuição da carga bacteriana no pulmão, sugerindo que a co-administração de vacinação do BCG com Mtb72F pode limitar a consolidação do pulmão.

9.3 Vacinas com vetores vivos

Vetores vivos, como as vacinas virais recombinantes ou *Salmonella* modificada contendo genes imunodominantes de *M. tuberculosis*, são candidatos à vacina e tem mostrado boa proteção em modelos animais (MOLLENKOPF et al., 2001). As vacinas virais recombinantes expressando Ag85A (MVA 85A) usando diferentes estratégias de vacinação em humanos (Homologas ou Heterologas) encontram-se em fase de teste pré-clínico. Entretanto, este tipo de vacina poderia provocar resposta imune contra o vetor, limitando o número de possíveis imunizações (MC SHANE et al., 2004).

10 Objetivo

Este trabalho visa abordar o estudo de alguns componentes da resposta imune à tuberculose para aplicabilidade em métodos de diagnóstico no rebanho bovino e imunização para controle da enfermidade nos animais e no homem.

Referências Bibliográficas

1. AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; VALLECILLO, A.J.; GUTIERREZ-PABELLO, J.A.; UAREZ-GUEMES, F.; MCNAIR, J.; CATALDI, A.; ESPITIA, C.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J.M. Optimizing antigen cocktails for *Mycobacterium bovis* Diagnosis in Herds With Different Disease Prevalence: ESAT6/CFP10 Mixture shows Optimal Sensitivity and Specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.80, n. 12, p. 4326-4335, 2006.
2. ADEREM, A.; UNDERHILL, M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol** , v.17, p.593–623, 1999.
3. AGRANOFF, D.; FERNANDEZ-REYES, D.; PAPADOPOULOS, M.C.; ROJAS, S.A.; HERBSTER, M.; LOOSEMORE, A.; TARELLI, E.; SHELDON, J.; SCHWENK, A.; POLLOK, R.; RAYNER, C.F.; KRISHNA, S. Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum. **Lancet**, Kidlington, v. 368, n.9540, p.1012-21, set. 2006.
4. ALDWELL, F.E.; WEDLOCK, D.N.; BUDDLE, B.M. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.74, n.8, p.45-51, 1996.
5. ALDWELL, F.E.; WEDLOCK, D.N.; BUDDLE, B.M. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN- γ and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M bovis* BCG. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.75, p.161-166, 1997.
6. ALITO, A.; MCNAIR, J.; GIRVIN, R.M.; ZUMARRAGA, M. BIGI, F.; POLLOCK, J.M.; CATALDI, A. Identification of *Mycobacteriu bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a

- virulent strain. **Brazilian Journal of Medical Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.11, p.1523-1531, 2003.
7. ALMEIDA, C.M.C.; VASCONCELOS JR, A.C.; KIPNIS, A.; ANDRADE, A.L.S.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB by the humoral immune response of Brazilian TB Patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 3, n.3, p.1-8, 2008.
 8. ALPAR, H.O.; PAPANICOLAOU, I.; BRAMWELL, V.W. Strategies for DNA vaccine delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Londres, v.2, n.5, p.829-42, 2005.
 9. AMADORI, M.; LYASHCHENKO, K.P.; GENNARO, M.L.; POLLOCK, J.M.; ZERBINI, I. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.85, p.379-389, 1995.
 10. AMENI, G.; TIBBO, M.J. Kinetics of interferon-gamma (IFN-gamma) release in the peripheral blood of calves vaccinated with BCG. **Immunoassay Immunochemistry**, Abingdon, v.23, n.2, p.245-53, 2002.
 11. ANDERSEN, P.; SMELEGAARD, B. CD4⁺ T-cell subsets that mediate immunological memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.2, p.621-629, 2000.
 12. ANON. Bovine tuberculosis erradications: uniform methods and rules . United States Departament of Agriculture, **Animal and Plant Health Inspection Service**, Washington, 2004.
 13. ARAÚJO, C.P.; LEITE, C.Q.F.; PRINCE, K.A.; JORGE, K.S.G.; OSÓRIO, A.L.A.R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.7, p.749-752, 2005.

14. ARMSTRONG, J.A.; HART, P.D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercule bacilli. Reversal of the unusual nonfusion pattern and observations on the bacterial survival. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 142, p.1-16, 1975.
15. BAROJA, M.L.; CEUPPENS, J.L. More exact quantification of interleukin-2 production by addition anti-Tac monoclonal antibody to cultures of stimulated lymphocytes. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.98, p.267-270, 1987.
16. BARRÓN, H.; MONTEGHIRFO, M.; RIVERA, N. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. **Anales de la Facultad de Medicina da Universidad Nacional Mayor de San Marcos**, Lima, v.67, n.1, 2006.
17. BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxinrite: the good, the bad and the ugly. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.271, p.1424-1437, 1996.
18. BEHAR, S. M.; DASCHER, C. C.; GRUNSBY, M. J.; WANG, C. R.; BRENNER, M. B. Susceptibility of mice deficient in CD1d or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York. v.189, p.1973-1980, 1999.
19. BELCHIOR, A.P.C. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais, Brasil. 2001. 55f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
20. BEKKER, L.G.; MOREIRA, A.L.; BERGTOLD, A.; FREEMAN, S.; RYFFEL, B.; KAPLAN, G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose-dependent. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, p.6954-6961, 2000.
21. BERTHET, F.X.; RASMUSSEN, P.B.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P.; GICQUEL, B.A. *Mycobacterium tuberculosis* operon

- encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). **Microbiology**, Washington, v.144, p. 3195-3203, 1998.
22. BONATO, V.L.D.; LIMA, W.M.F.; TACSON, R.E. Identification and characterization of protective T cells in hsp 65 DNA vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, p.169, 1998.
 23. BOOM, W.H. The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infect Agent Dis**, New York, v.5, p.73-81, 1996.
 24. BOTHAMLEY, G.H. Tuberculous pleurisy and adenosine deaminase. **Thorax**, London, v.40, n.6, p.593-594, 1995.
 25. BRANDT, L.; SKEIKY, Y.A.; ALDERSON, M.R.; LOBET, Y.; DALEMANS, W.; TURNER, O.C. et al. 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 and Immunity**, Washington, v.72, n.11, p.6622-32, 2004.
 26. BRENNER M.B.; MCLEAN, J.; DIALYNIS, B.P.; STROMINGER, J.L.; SMITH, J.A.; OWEN, F.L.; SEIDMAN, J.G.; ROSEN, S.I.P.F.; KRANGEL, M.S. Identification of a putative second T cell receptor. **Nature**, Minneapolis, v.322, p.145, 1986.
 27. BRITTON, W.J.; GILBERT, G.L.; WHEATLEY, J.; LESLIE, D.; ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; BRADLEY, P. Sensitivity of human gamma interferon assay and tuberculin testing for detecting infection with *Mycobacterium tuberculosis* in patients with culture positive tuberculosis. **Tubercule**, Edinburg, v.85, n.3, p.137-145, 2005.
 28. BRODIN, P.; MAJLESSI, L.; MARSOLLIER, L.; DE JONGE, M.I.; BOTTAI, D.; DEMANGEL, C. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and

- virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.1, p.88-98, 2006.
29. BUDDLE, B. M.; PARLANE, N. A.; KEEN, D. L. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, New York, v.6, p.1-5, 1999.
 30. BUDDLE, B.M.; LISLE, G.W.; PREFFER, A.; ALDWELL, F.E. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. **Vaccine**, Kidlington, v.13, p.1123-1130, 1995.
 31. CAMACHO, L.R.; ENSERGUEIX, D.; PEREZ, E.; GICQUEL, B.; GUILHOT, C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 34. p.257-67, 1999.
 32. CARUSO, A.M.; SERBINA, N.; KLEIN, E.; TRIEBOLD, K.; BLOOM, B.R.; FLYNN, J. L. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.162, p.5407-5416, 1999.
 33. CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; GUETIÉRREZ CANCELA, M.M.; FORSTER, F.; POLLOCK, J.M.; NEILL, S.D. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesions. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.124, p.46-51, 2001.
 34. CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; NEILL, S.D. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Record**, London, v.144, p.139-42, 1999.
 35. CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M.; EVANS, R.T.; FORSTER, F.; NEILL, S.D. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 119, p.27-44, 1998.

36. CEDENO, I.; DE OBALDIA, R.; SANJUR, O.; BAYARD, V.; ORTEGA-BARRIA, E.; ESCOBAR, C. Use of the polymerase chain reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. **Revue Scientific et Technic**, Paris, v.24, n.3, p.1067-75, 2005.
37. CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D.; FLYNN J.; BLOOM, B.R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, v.63, p.736-740, 1995.
38. CHAVEZ, C.E.; SUAREZ, A.L.P.; MERAZ, M.A.; ARRIAGA, C.; CARRANCA, A.C.; RODRIGUEZ, C.S.; MANCILLA, R. High-Level Expression of NRAMP1 in Peripheral Blood Cells and Tuberculous Granulomas from *Mycobacterium bovis*-Infected Bovines. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.11, p.7165-7168, 2001.
39. CHIODINI, R.J.; DAVIS, W.C. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: The predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4⁺ activity. **Microb. Pathogen**, London, v.13, p.447-63, 1992.
40. CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S.; THAYER-JR, W.R.; COUTU, J.A. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.20, n.5, p.966-971, 1984.
41. CHO, S.; MEHRA, V.; THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; SERBINA, N.; MAZZACCARO, R.J. ; FLYNN, J. L.; BARNES, P. F.; SOUTHWOOD, S.; CELIS, E.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L.; SETTE, A. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8_T cells in human tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v.97, p.12210-12215, 2000.

42. COLLINS, J.D, Meat plant surveillance and its role in the eradication of tuberculosis in cattle. In: **Selected Papers**, Dublin: Tuberculosis Investigation Unit, University College Dublin, 1996, p. 55–59.
43. CONNELL, T.G.; RANGAKA, M.X.; CURTIS, N.; WILKINSON, R.J. QuantiFERON-TB Gold: state of the art for the diagnosis of tuberculosis infection. **Expert Review of Molecular Diagnostic**, London, v.6, n.5, p.663-77, 2006.
44. COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFIN, J.P.; RUSSELL, D.G. ORME, I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.178, p.2243-2247, 1993.
45. COUSINS, D.V.; FLORISSON, N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. **Revue Scientifique et Technique/Office Internationa des Épizooties**, Paris, v.24, n.3, p.1039-1059, 2005.
46. D'ANDREA, A.; RENGARUJU, M.; VALIANTE, N.M.; CHEHIMI, J.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHAN, S.H.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; NICKBARG, E. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.176, p.1387-1398, 1992.
47. D'SOUZA, S.; ROSSEELS, V.; DENIS, O.; TANGHE, A.; DE SMET, N.; JURION, F. Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.7, p.3681-8, 2002.
48. DALCOMO, M.; MELO, F.A.F.; PINTO, W.P. II Congresso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes Brasileiras para a tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v.30, Suppl.1, 2004.
49. DANNENBERG, A.M.Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunology Today**, Cambridge, v.12, p.228-233, 1991.

50. DANNENBERG, A.M.Jr. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Hospital Practice**, New York, v.28, p.51-55, 1993.
51. DELIBERO, G.; FLESCHE, I.; KAUFMANN, S.H. Mycobacteria-reactive Lyt-2⁺ T cell lines. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.18, p.59–66, 1988.
52. DENIS, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cellular Immunology**, San Diego, v.132, p.150-157, 1991.
53. DENIS, M.; BUDDLE, B.M. IFN-gamma enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.83, n.6, p.643-50, 2005.
54. DENIS, M.; KEEN, D.L.; PARLANE, N.A.; STORSET, A.K. Bovine natural killer cells restrict the replication of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages and enhance IL-12 release by infected macrophages. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 87, n.1, p. 53–62, 2006.
55. DERRICK, S.C.; EVERING, T.H.; SAMBANDAMURTHY, V.K.; JALAPATHY, K.V.; TSUNGDA, H.S.U.; CHEN, B. Characterization of the protective T-cell response generated in CD4-deficient mice by a live attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine. **Immunology**, Oxford, v.120, p.192–206, 2006.
56. DIAZ, F.; MASSÓ, F.; PÁEZ, A.; VARELA, E.; SUARÉZ-GÜEMES, F.; MONTAÑO, L.F. Secretion of IFN- γ by bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium bovis* protein fractions obtained by isoelectric-focusing. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, London, v.67, p.203-212, 1999.
57. DOHERTY, T.M.; ANDERSEN, P. Vaccines for Tuberculosis: novel Concepts and Recent Progress. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.18, p.687-702, 2005.

58. DONDO, A.; GORIA, M.; MODA, G. Gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis: field evaluation of sensitivity and specificity. **Medicine Veterinary Preventive**, Ithaca, v.13, p.14-19, 1996.
59. ENDSLEY, J.J.; ENDSLEY, M.A.; ESTES, D.M. Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effector following activity with IL-12/15 and reduce *Mycobacterium bovis* BCG in infected macrophages. **Journal of Leucocyte Biology**, Bethesda, v.79, p.71-79, 2006.
60. ESPINOSA DE LOS MONTEROS, L.E.; GALAN, J.C.; GUTIERREZ, M.; SAMPER, S.; MARIN, J.F.; MARTIN, C.; DOMINGUEZ, L.; DE RAFAEL, L.; BAQUERO, F.; GOMEZ-MAMPASO, E.; BLAZQUEZ, J. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *M. tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.239-242, 1998.
61. FAN, X.L.; YU, T.H.; GAO, Q.; YAO, W. Immunological properties of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strain expressing fusion protein IL-2-ESAT-6. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v.38, n.10, p.683-90, 2006.
62. FEHERVARI, Z.; YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. **Trends in Immunology**, Oxford, v.27, n.3, p.109-111, 2006.
63. FERRAZ, J.C.; STAVROPOULOS, E.; YANG, M.; COADE, S.; ESPITIA, C.; LOWRIE, D.B. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, n.12, p.6945-50, 2004.
64. FIFIS, T.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis*

- antigens. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford. v.39, n.3, p.267-274, 1994.
65. FIFIS, T.; COSTOPOULOS, C.; CORNER, L.A.; WOOD, P.R. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.30, n.4, p.343-354, 1992.
66. FINE, M.P.E. BCG: The Challenge Continues. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v.33, p.243-245, 2001.
67. FLESCH, I.; KAUFMANN, S. Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of mycobacterium tuberculosis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.138, p.4408-4413, 1987.
68. FLOYD, M.M.; SILCOX, V.A.; JONES-JR, W.D.; BUTLER, W.R.; KILBURN, J. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by Using High-Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.5, p.1327-1330, 1992.
69. FLYNN, J.L.; CHAN, J. Immunology Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, California, v.19, p.93-129, 2001.
70. GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; FRANKEN, K.L.; DRIJFHOUT, J.W.; D'SOUZA, S.; NECKER, A.; HUYGEN, K.; OTTENHOFF, T.H. Identification of major epitopes of mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8_T cells in HLA-transgenic mice and humans. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.165, p.6463-6471, 2000.
71. GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. *Kuby Immunology*. 4.ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2000, 670p.
72. GONÇALVES, V.S.P. Tuberculose bovina em Minas Gerais: estudo da prevalência, fatores de risco e análise econômica de estratégias para

- controle da enfermidade. In: Encontro Mineiro sobre Tuberculose Bovina, Belo Horizonte, 08 a 10 de junho de 1998.
73. GRIFFIN, J.F.T.; CHINN, C.R.; RODGERS, C.R. Diagnostic strategies and outcomes on three New Zealand deer farms with severe outbreaks of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v.84, n.5, p.293-302, 2004.
 74. HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. OIE Manual (Amendment), 1995, 11p.
 75. HAMERMAN, J.A.; OGASAWARA, K.; LANIER, L.L. NK cells in innate immunity. **Current opinion in immunology**, London, v.17, p.29-35, 2005.
 76. HAUBNER, R.E. BCG Vaccination the Control of Tuberculosis in: Tuberculosis. **American Society for Microbiology**, Washington, v.23, p.263- 279, 1994.
 77. HENAO-TAMAYO, M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; ORDWAY, D.; GONZALES-JUARRERO, M.; STEWART, G.R.; YOUNG, D.B. A mutant of *Mycobacterium tuberculosis* lacking the 19-kDA lipoprotein Rv3763 is highly attenuated *in vivo* but retains potent vaccinogenic properties. **Vaccine**, Kidlington, v.25, p.7153-7159, 2007.
 78. HIBBS, Jr. J.B. Nitric a citotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.157, p.87-94, 1988.
 79. HIRSCH, C.S.; ELLNER, J.J.; RUSSELL, D.G.; RICH, E.A. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. **Journal of Immunol**, Baltimore, v.152, p.743–753, 1994.
 80. HOPE, J.C.; KWONG, L.S.; SOPP, P.; COLLINS, R.A.; HOWARD, C.J. Dendritic cells induce CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to

- Mycobacterium bovis* and *M. avium* in Bacille Calmette Guerin vaccinated and nonvaccinated cattle. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v.52, p.285-291, 2000.
81. HUEBNER, RE. BCG Vaccination the Control of Tuberculosis in: Tuberculosis. Edited by Barry Bloom. **American Society for Microbiology**, Washington, v.23, p.263- 279, 1994.
 82. HUYGEN, K.; CONTENT, J.; DENIS, O. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. **Nature Medicine**, New York, v.2, p.893, 1996.
 83. HUYGEN, K. DNA vaccines: application to tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v.2, n.12, p.971-78, 1998.
 84. ITOHARA, S.; NAKANISHI, N.; KANAGAWA, O.; KUBO, R.; TONEGAWA, S.; Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptors: analysis of gd cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, p.5094-5098, 1989.
 85. JOARDAR, S.N.; RAM, G.C.; GOSWAMIC, T.K. Dynamic changes in cellular immune responses in experimental bovine tuberculosis. **Medical Science Monitor**, Warsaw, v.8, n.11, p.471-480, 2002.
 86. JOHANSEN, P.; RAYNAUD, L.; YANG, M.; COLSTON, M.J.; TASCAN, R.E.; LOWRIE, D.B. Anti-*Mycobacterium* immunity induced by a single injection of *M. leprae* Hsp65-encoding plasmid DNA in biodegradable microparticles. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.90, n.2-3, p.81-85, 2003.
 87. JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; BASARABA, R.J.; GRUPPO, V.; PALANISAMY, G.; TURNER, O.C.; HSU, T. Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon-gamma. **Immunology**, Oxford, v.119, p.224-231, 2006.

88. JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; JOANNE, T.; GONCALVEZ-JUARRERO, M.; TURNER, O.C.; ORME, I.M. Stable T-cell population expressing an effector cell surface phenotype in the lungs of mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 1, p. 570-575, 2004.
89. JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; KIPNIS, A.; TAMAYO, M.H.; HARTON, M.; JUARRERO, M.G.; BASARABA, R.J.; ORME, I.M. Interleukin-10 production by lung macrophages in CBA xid mutant mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, Oxford, v.115, p.246-252, 2005.
90. KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: Current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.5-14, 1994.
91. KAUFMANN, S.H. Antibacterial vaccines: impact of antigen handling and immune response. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v.75, p.360-363, 1998.
92. KENNEDY, H.E.; WELSH, M.D.; BRYSON, D.G.; CASSINDY, J.P.; FORSTER, F.I.; HOWARD, C.J.; COLLINS, R.A.; POLLOCK, J.M. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1 (⁺) gamma delta T cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, p.1488-1500, 2002.
93. KITaura, H.; OHARA, N.; NAITO, M.; KOBAYASHI, K.; YAMADA, T. Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v.108, p.558–564, 2000.
94. KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. **Tuberculose do ambulatório à enfermagem**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p.259.
95. KUNG, P. T cell antigen receptor antibodies. **Nature**, London, v.330, p.501, 1987.

96. LAGE, A.P., ROXO, E., MULLER, E.E. POESTER, CAVALLÉRO, F.P.V., MAUAD, J.C. FERREIRA NETO, J.S., MOTA, P.M.P.C., GONÇALVES, V.S.P. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, 1.ed. Brasília, DF, 2006. 188p.
97. LI, Y.; BAO, L.; ZHANG, H.D.; LI, Y.S.; ZHU, H.L. Construction of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing ESAT-6 and its effects on macrophages. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, Guangzhou, v.26, n.7, p.923-6, 2006.
98. LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; WELSH, M.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. *In vitro* T-cell activation of monocyte-derived macrophages by soluble messengers or cell-to-cell contact in bovine tuberculosis. **Immunology**, Oxford, v.11, p.194-202, 2000.
99. LIÉBANA, E.; GIRVIN, R.M.; WELSH, M.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J. M. Generation of CD8 T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, p.1034-1044, 1999.
100. LIGHTBODY, K.A.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. **Veterinary Record**, London, v.142, n.12, p.295-300, 1998.
101. LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J.C.; SOUZA, G.N.; RIBEIRO, E.R.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L.S. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. **Zentralbl Veterinarmed B.** v.46, n.5, p.353-8, 1999.

102. LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. **Vaccine**, Kidlington, v.18, n.16, p.1712-16, 2000.
103. LOWRIE, D.B.; TASCO, R.E.; COLSTON, M.J.; SILVA, C.L. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. **Vaccine**, Kidlington, v.12, n.16, p.1537-40, 1994.
104. LOWRIE, D.B. DNA vaccines: an update. In: Robinson, A; Cranage, MP and Hudson, MJ **Vaccine Protocols**. 2.ed., Totowa, Humana Press inc., 2003. cap.23, p.377-389.
105. LYASHCHENKO, K.; WHELAN, A.O.; GREENWALD, R.; POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIR, H.M. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M bovis*. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, p.2462-2467, 2004.
106. LYASHCHENKO, K.P.; POLLOCK, J.M.; COLGANGELI, R.; GENNARO, M.L. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, p.5344-5349, 1998.
107. MACHUGH, N. D.; MBURU, J. K.; CAROL, M. J.; WYATT, C. R.; ORDEN, J. A.; DAVIS, W. C. Identification of two distinct subsets of bovine gd T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. **Immunology**, Oxford, v. 92, p.340–345, 1997.
108. MACKAY, C.R.; HEIN, W.R. A large proportion of bovine T cell express the $\gamma\delta$ receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. **International Immunology**, Oxford. v.1, p.540-545, 1989.
109. MACMICKING J.D.; NORTH, R.J.; LaCOURSE R.; MUDGETT, J.S.; SHAH, S.K.; NATHAN, C.F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.94, p. 5243-5248, 1997.

110. MAGGI, E.; PARRON, P.; MANETTI, R.; SIMMONELLI, C.; PICCINNI, M.P.; RUGIU, F.S.; DECARLI, M.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. **Journal of Immunology**, Baltimore. v.148, p.2142-2147, 1992.
111. MAHAIRAS, G.G.; SBO, P.J.; HICKEY, M.J.; SINGH, D.C.; STOVER, C.K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.1274-1282, 1996.
112. MAZZACCARO, R.J.; GEDDE, M.; JENSEN, E. R.; VAN SANTEN, H. M.; PLOEGH, H. L.; ROCK, K. L.; BLOOM, B. R. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.11786–11791, 1996.
113. McCORRY, T.; WHELAN, A.O.; WELSH, M.D.; McNAIR, J.; WALTON, E.; BRYSON, D.B.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M.; POLLOCK, J.M. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle experimentally infected with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. **Veterinary Record**, London, v.157, p.613-618, 2005.
114. MCSHANE, H.; PATHAN, A.A.; SANDER, C.R.; KEATING, S.M.; GILBERT, S.C.; HUYGEN, K. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boost BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nature Medicine**, New York, v.10, n.11, p.1240-44, 2004.
115. MEANS, T.K.; WANG, S.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; GOLENBOCK, D.T. FENTON, M.J. Human toll-like receptor2 mediate cellular

- activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.163, p.3920-3927, 1999.
116. MIETHKE, T. Interleukin 4 (BSF-1) induces growth in resting murine CD8 T cells triggered via cross-linking of T3 cell surface structures. **European journal of immunology**, Weinheim, v.18, p. 767–772, 1988.
117. MILLER, J.; JENNY, A.; PAYEUR, J. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium bovis* and *M. avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative organisms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.2328, p.1-9, 2002.
118. MILLER, J.; JENNY, A.; RHGYAN, J.; SAARI, D.; SAUREZ, D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *M. tuberculosis* complex organisms. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Turlock, v.9, n.3, p.244-249, 1997.
119. MOHAN, V.P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K.E.; TSANG, E.; FLYNN, J.L.; CHAN, J. Effects of tumor necrose fator alphaon host immune rresponse in choronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, p.1847-1855, 2001.
120. MOLLENKOPF, H.J.; GROINE-TRIEBKORN, D.; ANDERSEN, P.; HESS, J.; KAUFMANN, S.H. Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. **Vaccine**, Kidlington, v.19, n.28-29, p.4028-35, 2001.
121. MONAGHAN, M.; QUINN, P.J.; KELLY, A.P. A pilot trial to evaluate the γ -interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infected cattle under irish condictions. **Irish Vet Journal**, Dublin, v.50, p.229-232, 1997.

122. MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.L. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.11-124, 1994.
123. MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U. Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Palmerston, v.43, n.7, p.256-265, 1995.
124. MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, n.1, p.153-177, 1994.
125. MORRISON, W.I.; DAVIS, W.C. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4- CD8- T-lymphocytes (WC1, WC2) **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amhers, v.27, p.71-76, 1991.
126. MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v.7, p.145-73, 1989.
127. MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A. Mycobacterium bovis isolation in a dog. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 4, p. 1-3, 2001.
128. NAGAI, S.; WIKER, H.G.; HARBOE, M.; KINOMOTO, M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, p.372-382, 1991.
129. NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.6, p.3051-3064, 1992.
130. NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, 8841-8848, 2000.

131. NEILL, S.D.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, Edinburg. v.81, p.79-86, 2001.
132. NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.41-52, 1994.
133. NOREDHOEK, G.T.; VAN EMBDEN, J.D.A.; KOLK, A.H.J. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.10, p.2522-2525, 1996.
134. O'NULLAIN, E.M.; DAVIS, W.C.; COSTELLO, E.; POLLOCK, J.M.; MONAGHAN, M.L. Detection of the *Mycobacterium bovis* infection in cattle using an immunoassay for bovine soluble interleukin-2 receptor-alpha (sIL-2R-alpha) produced by blood T-lymphocytes following stimulation with tuberculin PPD. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam. v.56, p.65-76, 1997.
135. O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. **Tubercule and Lung Disease**, Edinburgh, v.1, p.1-46, 1995.
136. OHARA, N.; NISHIYAMA, T.; OHARA-WADA, N.; MATSUMOTO, S.; MATSUO, T.; YAMADA, T. Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85 C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. **Microbial Pathogenesis**, London, v.23, p.303-310 1997. (a).
137. OHARA, N.; OHARA-WADA, N.; KITaura, H.; NISHIYAMA, T.; MATSUMOTO, S.; YAMADA, T. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, p.3680-3685, 1997. (b).
138. OHARA, N.; OHARA-WADA, N.; KITaura, H.; NISHIYAMA, T.; MATSUMOTO, S.; YAMADA, T. Analysis of the genes encoding the

- antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, p.3680-3685, 1997.
139. Organização Internacional de Epizootias, **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. [on line] 5.ed., Paris, 2004. Disponível em: www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A_summry.htm. Acesso em 20/09/2006.
140. OTTENHOF, T.H.; KUMARARATNE, D.; CASANOVA, J.L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology Today**, Cambridge, v.19, p.491-494, 1998.
141. PALMER, M.V.; WHIPPLE, D.L.; RHYAN, J.C.; BOLIN, C.A.; SAARI, D.A. Granuloma development in cattle after intratonsillar inoculation with *Mycobacterium bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.60, p.310-315, 1999.
142. PAULA, L.; SILVA, C.L.; CARLOS, D.; PERES, C.M.; SORGI, C.A.; SOARES, E.G. Comparison of different delivery systems of DNA vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice and guinea pigs. **Genetic Vaccines and Therapy**, London, v.5, p.2, 2007.
143. PINTO, R.; SAUNDERS, B.M.; CAMACHO, L.R.; BRITTON, W.J.; GICQUEL, B.; TRICCAS, J.A. *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacilli Calmette-Guerin vaccine. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.189, n.1, p.105-2, 2004.
144. POLLOCK, I.M.; POLLOCK, D.A.; CAMPBELL, D.G.; GIRVIN, R.M.; CROCKARD, A.D.; NEILL, S.D.; MACKIE, D.P. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Immunology**, Oxford, v.87, p.236-241, 1996.

145. POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.175, n.5, p.1251-1254, 1997.
146. POLLOCK, J.M.; McNAIR, J.; BASSETT, H.; CASSIDY, J.P.; COSTELLO, E.; AGGERBECK, H.; ROSENKRANDS, P. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.5, p.1856-1860, 2003.
147. POLLOCK, J.M.; McNAIR, J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; KENNEDY, H.E.; MACKIE, D.P.; NEILL, S.D. Immune responses in bovine tuberculosis, **Tubercule**, Edinburgh, v.81, p.103-107, 2001.
148. POLLOCK, J.M.; NEILL, D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, London, v. 163, p.115-127, 2002.
149. POLLOCK, J.M.; RODGERS, J.D.; WELSH, M.D.; McNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.112, p.141-150, 2006.
150. POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D.; McNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam. v.108, n.2, p.37-43, 2005.
151. PORCELLI, A.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. CD1b restricts the response of human CD4-8-T lymphocytes to microbial antigen. **Nature**, London, v.360, p.593-597, 1992.
152. PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 188-1988: Conquest and Controversy. **Journal of Comparative Pathology**, London, v.99, p.357-399, 1988.

153. RAMBUKKANA, A.; DAS, P.K.; KOLK, A.H.; BURGGRAAF, J.D. KUIJPER, S.; HARBOE, M. Identification of a novel 27 kDa protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture fluid by monoclonal antibody specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Scandinavian journal of immunology**, Oxford, v.37, p.4714-478, 1993.
154. RHODES, S.G.; GAVIER-WIDEN, D.; BUDDLE, B.M.; WHELAN, A.O.; SINGH, M.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.5, p.2573-2578, 2001.
155. RHODES, S.G.; GAVIER-WIDEN, D.; BUDDLE, B.M.; WHELAN, A.O.; SINGH, M.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.5, p.2573-2578, 2000.
156. RHODES, S.G. Distinct response kinetics of gamma-interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington. v.68, p.5393–5400, 2000.
157. RIGANO, M.M.; DREITZ, S.; KIPNIS, A.P.; IZZO, A.A.; WALMSLEY, A.M. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v.24, p.691–695, 2006.
158. RINKE, W.T.F.; BEKELIE, S.; OSLAND, A.; WIELES, B.; JANSON, A.A.; THOLE, J.E. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C and related and MPT51 proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, p.3642-3647, 1993.
159. RITACCO, V.; LOPEZ, B.; de KANTOR, I.N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A.; Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Research in veterinary science**, London, v.50, p.365-367, 1991.

160. ROSAT, J.P.; GRANT, E.P.; BECKMAN, E. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8 $\alpha\beta$ T cell pool. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.162, p.366-373, 1999.
161. ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, p.91-97, 1996.
162. RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Respiratory Veterinary Science**, v.81, n.2, p.190-210, 2006.
163. SABLE, S.B.; GOYAL, D.; VERMA, I.; BEHERA, D.; HULLER, G. Lung and blood mononuclear cell responses of tuberculosis patients to mycobacterial proteins. **The European Respiratory Journal**, Copenhagen, v.29, n.2, p.337-46, 2007.
164. SANO, K.; HANDEA, K.; TAMURA, G.; SHIRATO, K. Ovalbumin (OVA) AND *Mycobacterium tuberculosis* bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper cells forward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v.20, p.1260-1267, 1999.
165. SAPAROV, A.; WAGNER, F.H.; ZHENG, R.; OLIVER, J.R.; MAEDA, H.; HOCKETT, R.D.; WEAVER, C.T. Interleukin-2 expression by a subpopulation of primary T cells is linked to enhanced memory/effector function. **Immunity**, Cambridge, v.11, p.271-280, 1999.
166. SCHLESINGER, L.S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **Journal of Immunology**, Copenhagen, v.150, p.2920–2930, 1993.

167. SEDDON, B.; MASON, D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor β and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4⁺CD45RC⁻ cells and CD4⁺CD8⁻ thymocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.189, p. 279–288, 1999.
168. SELVAKUMAR, N.; RAVIKUMAR, D.; SIVAGAMASUNDARI, S.; GOPI, P.G.; NARAYANAN, P.R. A novel method of staining acid-fast bacilli in sputum containers. **The Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v.123, n.6, p.776-80, 2006.
169. SILVA, CL. 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 and Immunology**, Washington, v. 64, p.2400-7, 1996.
170. SINGH, K.K.; DONG, Y.; BELISLE, J.T.; HARDER, J.; ARORA, V.K.; LAAL, S. Antigens of Mycobacterium tuberculosis recognized by antibody during incipient, subclinical tuberculosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.2, p.354-358, 2005.
171. SKEIKY, Y.A.; ALDERSON, M.R.; OVENDALE, P.J. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **Journal of Immunology**, Copenhagen, v.172, p.7618-28, 2004.
172. SKEIKY, Y.A.W.; SADOFF, J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Microbiology**, New York, v.4, p.469-476, 2006.
173. SKINNER, M.A.; BUDDLE, B.M.; WEDLOCK, D.N.; KEEN, D.L.; de Lisle, G.W.; TASCAN, R.E.; FERRAZ, J.C.; LOWRIE, D.B. COCKLE, P.J.; VORDERMEIR, H.M. HEWINSON, R.G. A DNA prime-BCG boost vaccination strategy in cattle induces protection against bovine

- tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, p.4901-4907, 2003.
174. SMITH, S.M. Decreased IFN- γ and increased IL-4 production by human CD8⁺ T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients. **Tuberculosis**, Edinurg, v.82, p.7–13, 2002.
175. SMYTH, A.J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; POLLOCK, J.M. *In vitro* responsiveness of $\gamma\delta$ T-cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: Predominant involvement of WC1(+) cells. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, p.89-96, 2001.
176. SNIDER, D.E. The tuberculin skin test. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v.125, n.3, p.108-118, 1982.
177. SORENSEN, A.L.; NAGAI, S.; HOUEN, G.; ANDERSEN, P.; ANDERSEN, A.B. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunology**, Washington, v.63, p.1710-1717, 1995.
178. STEAD, W.W. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? **American Review of Respiratory Disease**, New York, v.95, p.729-745, 1967.
179. STENGER, S.; MAZZACCARO, R.J.; UYEMURA, K.; CHO, S.; BARNES, P.F.; ROSAT, J.P.; SETTE, A.; BRENNER, M.B.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. **Science**, Cambridge, v.276, p.1684-1687, 1998.
180. STENGER, S.; MODLIN, R.L. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.2, p.89-93, 1999.
181. TAN, J.S.; CANADY, D.H.; BOOM, W.H.; BALAJI, S.K.; RICH, E.A. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium*

- tuberculosis* infection. **The Journal Immunology**, Baltimore, v.159, p.290-297, 1997.
182. THIBERT, L.; LAPIERRE, S. Routine Application of High-Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n.7, p. 1759-1763, 1993.
183. THOM, M.; MORGAN, J.H.; HOPE, J.C.; VILLAREAL-RAMOS, B.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amhers, v.102, n.4, p.399-412, 2004.
184. THORNS, C.J.; MORRIS, J.A. The immune spectrum of *Mycobacterium bovis* infection in some mammalian species: a review. **Veterinary Bulletin**, Weybridge, v.53, p.543-550, 1983.
185. TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunology Today**, Cambridge, v.14, p.335-337, 1993.
186. VAN CREVEL, R.; TOM, H.M. OTTENHOFF.; JOS, W.M.; MEER, V.D. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n.2, p.294-309, 2002.
187. VESOSKI, B.; TURNER, O.C.; TURNER, J.; ORME, I.M. Gamma interferon production by bovine gamma delta T following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. **Infection and Immunology**, Washington, v.72, p.4612-4618, 2004.
188. VILLARREAL-RAMOS, B.; MCAULAY, M.; CHANCE, V.; MARTIN, M.; MORGAN, J.; HOWARD, C. J. Investigation of the role of CD8_ T cells in bovine tuberculosis in vivo. **Infection and Immunology**, Washington, v.71, n.8, p.4297-4303, 2003.
189. VORDERMEIER, H.M.; HUYGEN, K.; SINGH, M.; HEWINSON, R.G.; XING, Z. Immune responses induced in cattle by vaccination with a

- recombinant adenovirus expressing mycobacterial antigen 85A and Mycobacterium bovis BCG. **Infection and Immunology**, Washington, v.74, n.2, p.1416-8, 2006.
190. VORDERMEIER, H.M.; HUYGEN, K.; SINGH, M.; HEWINSON, R.G.; XING, Z. Immune responses induced in cattle by vaccination with a recombinant adenovirus expressing Mycobacterial antigen 85A and Mycobacterium bovis BCG. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.2, p.1416-8, 2006.
191. WANGOO, A; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. 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**, London, v.133, n.4, p.223-234, 2005.
192. WATERS, W.R; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; MCNAIR, J.; POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P.; LYASHCHENKO, K.P. Early antibody responses to experimental Mycobacterium bovis infection of cattle. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v.13, n.6, p.648-54, 2006.
193. WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, Berlin, v.53, n.7, p.321-5. 2006.
194. WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MCNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, Oxford, v.114, p.101-111, 2005.

195. WHIIPPLE, D.L.; BOLIN, C.A.; DAVIS, A.J. Comparison of sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial γ -interferon for diagnosis of bovine tuberculosis. **American Journal of Veterinary Research**, New York, v.56, n.4, p.415-419, 1995.
196. WIJNGAARD, P.L.J.; METZELAAR, M.J.; MACHUGH, N.D. Molecular characterisation of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- gamma-delta T-lymphocytes. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.149, p.3273-3277, 1992.
197. WILSON, R.A.; MAUGHAN, W.N.; KREMER, L.; BESRA, G.S.; FÜTTERER, K. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. **Journal of Molecular Biology**, London, v.335, n.2, p. 519-30, 2004.
198. WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; PLACKETT, P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of interferon-gamma. **Research in Veterinary Science**, London, v.49, n.1, p.46-49, 1990.
199. WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S. Field comparisons of the interferons-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.68, p.286-290, 1991.
200. WOOD, P.R.; JONES, S.L. BOVIGAMTM: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tubercule**, London, v.2001, p.147-155, n.1, 2001.
201. XING, Z.; SANTOSUOSSO, M. 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. **J Journal of Leukocit Biology**, New York, v.68, n.6, p.897-902, 2000.
202. YEARSLEY, D.; EGAN, J.; COSTELLO, E.; O'RELLY, P. HEWINSON, R.G.; An avaluation of an anamnestic ELISA for the detection of

- tuberculous cattle. **Irish Veterinary Journal**, London, v.51, n.4, p.303-306, 1998.
203. YONEDA, T.; ELLNER, J.J. CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.158, p.395-403, 1998.
204. YOUNG, S.; O'DONNELL, M.; LOCKHART, E.; BUDDLE, B.; SLOBBE, L.; LUO, Y.; DE LISLE, G.; BUCHAN, G. Manipulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.80, n3, p.209-15, 2002.

CAPÍTULO 2 The use of MPT-51, BCG and Ag85 as antigens in an ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis

Abstract

Tuberculosis is a chronic disease in cattle caused by intracellular infection with *Mycobacterium bovis*, which leads to significant economic losses. The disease control is based on the intradermal tuberculin test (ITT). This test has some restrictions, such as the high incidence of false negative and positive results. The aim of this work was to investigate an in house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using MPT-51 and Ag85 and *M. bovis*- BCG as antigens in order to evaluate their performance in the diagnosis of bovine tuberculosis. The test groups consisted of 208 serum samples from ITT-positive animals and 54 samples from ITT-negative animals, collected in an endemic region of Brazil. ELISA using Ag85 and *M. bovis*-BCG were able to discriminate ITT positive from ITT negative animals, while MPT-51 did not demonstrate a good performance. According to the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the tests, *M.bovis*-BCG presented the best scores (Se=81% and Sp= 90%). The *M. bovis*-BCG and Ag85 were strongly recognized by the serum of naturally tuberculosis infected bovine. These antigens can be further investigated to be used as a tool for the diagnosis tuberculosis in bovines.

Keywords: Bovine tuberculosis, Bacillus Calmette-Guérin, Diagnosis, Recombinant antigens.

Introduction

Tuberculosis is a chronic disease in cattle caused by intracellular infection with an acid-fast bacterium, *Mycobacterium bovis* (Pollock and Neill, 2002). The infection is characterized by granulomatous lesions in the respiratory tract and draining lymph nodes, composed by a pronounced infiltration of mononuclear cells, including macrophages and lymphocytes (Neil et al., 1994; Cassindy et al, 2001).

Latin America and the Caribbean have approximately 300 million cattle heads and the prevalence of TB in this population is between 0.9 and 2.9%, depending on the region and type of productive system (Kantor and Ritacco 1994). The Brazilian bovine population is about 200 million animals. During 1989 and 1998, official notification data indicated a national prevalence of 1.3% infected animals (BRASIL, 2006). Bovine tuberculosis leads to significant economic losses (Pollock and Neill, 2002). The impact varies by continent and economic status of countries. In regions where TB is endemic, it exerts an adverse influence on livestock economy due to the culling of positive animals and economic barriers to national and international trade. In addition, *M. bovis* remains a serious zoonotic threat to human health in developing countries (Daborn and Grange, 1993).

Nowadays, programs to control bovine tuberculosis are based on the intradermal tuberculin test (ITT), which relies on a memory immune response against purified protein derivatives (PPD) from *M. bovis* (Monaghan et al., 1994). Nevertheless, this test has restrictions, such as the high incidence of false negative and positive results (Pollock and Neill, 2002; Monaghan et al.,

1994; Doherty et al., 1996). The dynamics of bovine tuberculosis among animals, as well as the period that the animal remains in the livestock, and the impact upon the ability to make a detectable immune response, thus, affect directly the ability of the ITT to efficiently diagnose bovine tuberculosis (Snider; 1982; Rua-Domenech et al., 2006).

A more effective method to detect infected animals needs to be developed. Several tests have been evaluated as substitutes for ITT (Cousins et al., 1998; Wood and Jones, 2001; Buddle et al., 2001). The performance of enzyme-linked immunosorbent assays in the diagnosis of bovine tuberculosis has been investigated (Plackett et al., 1989; Yearsley et al., 1998; Lilenbaum et al., 2001; Thom et al., 2004; Pollock et al., 2005). Antibody-based tests may help to detect ITT-negative or anergic cattle in advanced phases of infection (Plackett et al., 1989), and also may contribute to elucidate the epidemiological status of farms (Amadori et al., 1998).

The combination of some immunogenic protein antigens involved in humoral immune responses of *M. bovis*-infected bovines can be used to insure coverage of a possible variation in the immune response of cattle (Lyaschenko et al., 1998; Lightbody et al., 2000). The protein MPT-51 is one of the major proteins in the culture filtrate of *M. bovis* (Ohara et al., 1995; Lyashchenko et al. 1998). Another candidate protein antigen, Ag85, induces antibodies in bovines experimentally infected with *M. bovis* (AN5 strain) showing the immunogenicity of this antigen (Harboe et al., 1990). Bacillus Calmette-Guérin (BCG), an attenuated *M. bovis* strain after nearly 230 serial *in vitro* passages, is largely used as a human vaccine, being available in almost all continents and retains the majority of the wild type *M. bovis* antigens (Calmette et al., 1927;

Behr et al., 1999). In this regard, the recombinant antigens MPT-51 and Ag85, and the *M.bovis*-BCG bacilli are good options to be used in a serological diagnosis of bovine tuberculosis. The aim of this study was to use MPT-51 and Ag85 recombinant antigens and *M.bovis*-BGC to detect tuberculosis infected cattle employing an antibody-based test.

Materials and methods

Animals

ITT positive cattle group: The test group consisted of 208 serum samples from tuberculin skin test-positive bovines from dairy farms located in state of Goiás and the Federal District, Brazil.

ITT negative cattle group: The negative test animals consisted of 54 serum samples of cattle of the same age and regions as the ITT-positive group.

Serum samples: The serum samples of animals were collected after the ITT and allocated into group A (ITT-positive animals, 208 samples) and group B (ITT-negative animals, 54 samples). Sera were separated by centrifugation and stored in 2-ml aliquots in cryotubes at -20°C until usage.

ELISA

The MPT-51 and the Ag85 recombinant antigens were produced and donated from Colorado State University (CSU) through the material agreement transference contract N° NO1-AI-75320. Lyophilized BCG was kindly donated by Butantan Institute - São Paulo, Brazil. The bacilli were heated and sonicated for 30 min prior to use.

Flat-bottomed polystyrene Immulon 2 microtitre plates (Corning Incorporated Costar[®], New York, USA) were coated with 1 μ g/well of rMPT-51, rAg85 or BCG in carbonate buffer (pH 9.6) and incubated for 18 h at 8°C. Blockage was done with 100 μ l of PBS 1% gelatin per well for 120 min at 37 °C and the serum dilutions in PBS 0.1% gelatin were added. For the rMPT-51 ELISA test the optimized serum dilution was 1:800, while a 1:40 dilution was done for rAg85 and BCG. The plates were incubated for 60 min at 37°C. The plates were then washed six times with PBS, 0.05% tween-20. The plates were washed again, and incubated at 37°C with 50 μ l per well of a monoclonal anti-bovine immunoglobulin G (IgG) conjugated with peroxidase (1:15,000 in PBS, 0.1% gelatin; Sigma, St Louis, MO, USA) for 60 min. Finally, 50 μ l of chromogen substrate was added (5mg of OPD; 20 μ l of H₂O₂ and 5 ml of citrate phosphate buffer, pH 5.2). In order to stop the reaction H₂SO₄ 4N (50 μ l/well) was added, and the plates were read at 492 nm. Wells without sera, or without antigen were used as controls for non-specific conjugate binding. The mean absorbance values were calculated from the duplicate wells for each serum. The cut off was established using the Roc curve. This analysis was performed using the SPSS version 11.0 and EpilInfo 6.04 software.

Statistics

For statistical analysis, the Graph Pad Prism[®] version 4.02 and EXCEL Microsoft[®] Excel software were used. The ANOVA test was used to evaluate the variance between the groups. Student's *t* test compared the group samples. It was considered significantly different when $p < 0.05$.

Results

According to the Roc curve, the MPT-51 presented an area under the curve of 0.4 and thus did not have a good performance. For this reason the specificity chosen was 44% allowing a sensitivity of 48% and the cut off was O.D. ≥ 1.301 . For Ag85, the Roc curve considered an area under the curve of 0.7, consequently a specificity of 88% and sensitivity of 45% was adopted. The cut off was O.D. ≥ 0.898 . Analysis of assays using BCG was done with the cut off at O.D. ≥ 1.287 . For the bacilli the Roc curve presented the area under the curve of 0.9 and consequently a sensitivity of 81% and specificity of 90% were adopted (Table 1).

The distribution of ELISA O.D. values in the detection of antibodies against rMPT-51, rAg85, and BCG of the two tested bovine groups are shown in Figure 1. When antibodies against rMPT-51 were analyzed for Group A (ITT-positive animals), the mean O.D. value observed was 1.310 ± 0.518 (Fig. 1C) while for rAg85 antigen (Fig. 1B) and BCG (Fig. 1A) the mean O.D. values were 0.930 ± 0.512 and 1.642 ± 0.449 respectively. For Group B (ITT-negative animals) antibody titers against rMPT-51, rAg85, and BCG were, respectively, 1.357 ± 0.533 , 0.618 ± 0.223 and 1.037 ± 0.248 . In all ELISA tests, the mean O.D. of ITT-positive animals was higher than the ITT-negative animals ($p < 0.05$), except for MPT-51.

Considering the cut off value adopted for each antigen, the percentage of false positive results for rMPT-51 was 48.14%, for rAg85 it was 11% and for BCG it was 9.25%. Moreover, 39.42%; 54.80%; 17.78% of the cattle presented false negative results when rMPT-51, rAg85 and BCG were used as antigens, respectively.

4. Discussion

The diagnosis of bovine TB using the ITT presents several deficiencies. The animals' response to the PPD antigens depends on several factors: the stage of the disease; co-infection with environment mycobacteria; vaccination against *M. avium* sp. *paratuberculosis*; concomitant infection with viruses; transport and nutritional stress. In addition, other problems arise from the tuberculin antigen used in some farms, because of the use of low-potency products. Finally, some problems can occur due to the lack of experience and attention of the technician, and also to the use of equipment of poor quality according to (Snider, 1982). All these aspects point to the need for a diagnostic test for bovine TB that detect infected animals not screened by ITT, which needs to be easy to manage and at least with the same specificity and sensitivity as the ITT.

At the beginning of infection, the immune response to tuberculosis in cattle is predominantly cellular, however, with advance, or disseminated disease, the humoral immune response becomes very important as described by (Pollock and Neill, 2002; Pollock et al., 2005; Waters et al., 2006; Ritacco et al., 1990). For this reason the development of a new diagnosis test for bovine tuberculosis, based on the humoral immune response, should be considered. In this study we tested three possible candidates for TB bovine diagnosis. Among the tested antigens, *M.bovis*-BCG presented the best performance in our in-house ELISA test.

The humoral immune response involves several antigens that can be recognized in different stages of the disease (Lyashchenko et al., 1998). However, most antigens present low specificity and sensibility, restricting their

use in endemic areas. This fact could explain the low response to rMPT-51 antigen compared with *M. bovis*-BCG and rAg85. Probably, rMPT-51 is not a dominant antigen in endemic areas like Brazil. Additionally, in an infection model, rMPT-51 specific antibodies appear only during the peak of the infection, about 35 to 42 days post infection (Amadori et al., 2002). The time of the natural infection progression in the animals included in this study could not be estimated and probably is superior than that period, and therefore we could have missed the time of infection that would be the best for MPT-51 antibody recognition. In our study it was impossible to distinguish healthy and sick animals because animals were naturally infected and the low sensitivity and specificity of the ITT test. The serum from control group was also able to recognize the rMPT-51. This observation could be explained by the fact that MPT-51 is present not only in the tuberculosis complex but also in other *Mycobacterium* species (Ohara et al., 1995).

Other studies have tested Ag85 antigen for using as diagnostic tool in bovine tuberculosis (Rhodes et al., 2000; Linlebaum et al., 2001). The Ag85 is a complex constituted of 85A, 85B, and 85C proteins that are encoded by three different genes. These proteins present similarities at amino acid and gene levels among the majority of *Mycobacterium sp.* Bacilli, and thus cross-reactivity is expected, mainly because of the occurrence of many species of environmental mycobacteria. Contrary to previous studies (Lilebaum et al., 2001), which found a sensitivity of 91.3% and specificity of 94.8% for r-Ag85, we found lower sensitivity and sensibility for this antigen. This fact could explain the observed low sensibility in spite of the fairly high specificity observed in our results.

BCG has been extensively used in bovine tuberculosis vaccine studies (Aldewell et al., 1995; Vordermeir and Hewinson, 2006; Vordermeir et al., 2006). One old study described the usefulness of BCG as a diagnostic tool (Laborie & Laborie, 1957) but in the literature, this is the first time that *M.bovis*-BCG is employed in an ELISA. The results presented here using *M. bovis*-BCG shows that the use of a large repertoire of antigens is better for diagnostic purposes. Use of *M.bovis*-BCG as a diagnostic tool represents an advantage for developing countries like Brazil, because of its low cost and also because it could be used to discriminate sick animals from those presenting cross-reactivity to TB antigens because of exposure to environmental mycobacteria. The proteins contained in *M. bovis*-BCG proved to be a good source of antigen to be used in the diagnosis of bovine tuberculosis because they were capable of differentiating negative and positive animals.

Considering time, distances and costs, there are many advantages in using serological methods such as ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis when comparing to ITT. First, the elimination of another handling step of the animals. Second, just one visit of the veterinarian to the ranch is necessary. Brazil is a continental country and many of the farms are very distant from urban centers, making it difficult for posterior visits of veterinarians. The third advantage of an ELISA test is that blood sampling can be repeated as often as necessary, without altering the immune status of the animal. Also, the interpretation is based on numerical values, more objective than the observation of the swelling of the skin. Finally, the ELISA test can detect ITT-anegetic animals, since retaining these animals on farms represent a risk factor for spreading bovine tuberculosis (Plackett et al., 1989; Lilenbaum et al., 1999).

Therefore, due to the problems shown above, besides the transmission dynamic of bovine tuberculosis among the animals, the time needed for an animal to present a detectable immune response, no diagnostic method is efficient enough to detect all the infected animals, so several diagnostic tests have been developed (Rua-Domenech et al.,2006). It is a fact that these animals keep the bacilli in the herd. However, the ITT-anergic animals can be detected through the serologic test by ELISA (Wiker et al., 1986 and Yearsley et al., 1998).

Whole *M. bovis*-BCG bacilli showed the best performance to be used as an antigen for a bovine TB ELISA, when compared to the recombinant antigens (MPT-51 and Ag85, $p < 0.05$). However, Ag85 was strongly recognized by the serum of those animals, and therefore these antigens demonstrate a good potential to be used as a tool in the diagnosis of bovine tuberculosis. Further work should be performed in different epidemiological settings to validate the proposals set forth in this work.

Acknowledgements

Supported by grants from Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil.

References

- Aldwell, F.E., Pfeffer, A. Delisle, G.W., Jowett, G., Heslop, J., Keen, D., Thomson, A., Buddle, B.M., 1995. Effectiveness of BCG vaccination in protecting possums against bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 58, 90-95.
- Amadori, M., Lyashchenko K.P., Genaro, M.L., Pollock, J.M., Zerbini, I., 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 85, 379-389.
- Amadori, M., Tameni, S., Scaccaglia, P., Cavarani, S., Archetti, I.L. Quondam Giandomenico, R., 1998. Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis* infected bovine herds. *Journal of Clinical Microbiology.* 35, 566-568.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik G.K., Rane S., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* 284, 1520–1523.
- Buddle, B.M., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Andersen, P., de Lisle, G.W., 2001. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.* 80, 37-46.
- Calmette, A., Guerin, C., Negre L., Bocquet, A., 1927. Sur la vaccination préventive des enfants nouveau-nés contre la tuberculose par le BCG. *Ann. Inst. Pasteur.* 3, 201.

- Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Guetiérrez Cancela, M.M., Forster, F., Pollock, J.M., Neill, S.D., 2001. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesions. *J. Comp. Path.* 124, 46-51.
- Cousins et al., 1998 In: D.V. Cousins, L.A. Corner, J.W. Tolson, S.L. Jones and P.R. Wood, Editors, *Eradication of bovine tuberculosis from Australia: Key management and technical aspects*, CSL, Australia (1998).
- Daborn, C.J., Grange, J.M., 1993. HIV AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* 149, 405-417.
- Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., Davis, W.C., 1996. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 49, p.307-320.
- Harboe, M., Wiker, H.G., Duncan, R., Garcia, M.M., Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C., Nagai, S., 1990. Protein G-Based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Anti-MPB70 Antibodies in Bovine Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 28, 913-921.
- Kantor, I.N., Ritacco, V., 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: Current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40, 5-14.
- Laborie, F., Laborie R., 1957. BCG and bovine tubercle bacillus in diagnosis of bovine evolutive tuberculosis by hemagglutination, the

reticuloendothelial index, intravenous tuberculin test and paper microelectrophoresis. *Rev Pathol Gen Physiol Clin.* 57, 1707-17.

Lage, A.P., Roxo, E., Muller, E.E. Poester, Cavalléro, F.P.V., Mauad, J.C. Ferreira Neto, J.S., Mota, P.M.P.C., Gonçalves, V.S.P. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. (PNCEBT). Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

Lightbody, K.A., Mcnair, J., Neill, S.D., Pollock, J.M., 2000. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunized and in tuberculin skin test reactor cattle. *Vet. Microbiol.* 75, 177-188.

Lilenbaum, W., Pessolanl, M.C.V., Fonseca, L.S., 2001. The Use of Ag85 Complex as Antigen in ELISA for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Dairy Cows in Brazil. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health.* 48, 161-166.

Lilenbaum, W., Schettini, J.C., Souza, G.N., Ribeiro, E.R., Moreira, E.C., Fonseca, L.S., 1999. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentralbl Veterinarmed B.* 46, 353-8.

Lyashchenko, K.P., Pollock, J.M., Colgangel, R., Gennaro, M.L., 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 66, 5344-5349.

- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.L., 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40, 11-124.
- Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J., 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 10, 41-52.
- Ohara, N., Kitaura, H., Hotokezaka, H., Nishiyama, T., Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Naito, M., Yamada, T., 1995. Characterization of the gene encoding the MPB51, one of major secreted proteins antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scand J Immunol.* 41, 433-442.
- Plackett, P., Ripper, J., Corner, L.A., Small, K., de Wittle, K., Melville, L., Hides, S., Wood, P.R., 1989. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust Vet. J.* 66, 15-19.
- Pollock, J.M., Neill, D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163, 115-127.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D., Mcnair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 108, 37-43.
- Rhodes S.G., Gavier-Widen, D., Buddle, B.M., Whelan, A.O., Singh, M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2000. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity.* 68, 2573-2578.

Ritacco, V., Lopez, B., Barrera, L., Nader, A., Fliess, E., Kantor, I.N., 1990.

Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Vet. Med.* 37, 19-27.

Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G.,

Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81, 190-210.

Snider, D.E., 1982. The tuberculin skin test. *Am Rev Respir Dis.* 125, 108-

118.

Thom, M., Morgan, J.H., Hope, J.C., Villareal-Ramos, B., Martin, M.,

Howard, C.J., 2004. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 399-412.

Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Buddle, B.M., Pollock, J.M. Hewinson,

R.G., 2006. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal.* 171, 229-244.

Vordermeier, M., Hewinson, R.G., 2006. Development of cattle TB vaccines

in the UK. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112, p.38-48.

Waters, W.R, Palmer, M.V., Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Greenwald, R., Esfandiari, J., Mcnair, J., Pollock, J.M., Andersen, P., Lyashchenko, K.P., 2006. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 13, 648-54.

Wiker, H.G.; Harboe, M.; Nagai, S.; Patarroyo, M.E.; Ramirez, C.; Cruz, N., 1986. MPB59, a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 81, 307-314.

Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. BOVIGAMTM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 2001, 147-155.

Yearsley, D., Egan, J., Costello, E., O'relly, P., Hewinson, R.G., 1998. An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculosis cattle. *Irish Vet. J.* 51, 303-306.

Table 1. Sensitivities and specificities of the ELISA test for the TB diagnosis

ELISA	OD cut off	No. of animals positive/no. tested		Sensitivity (%)	Specificity (%)
		ITT positive animals	ITT negative animals		
MPT-51	1.301	114/208	26/54	44	48
Ag85	0.898	100/208	6/54	45	88
BCG	1.287	171/208	5/54	81	90

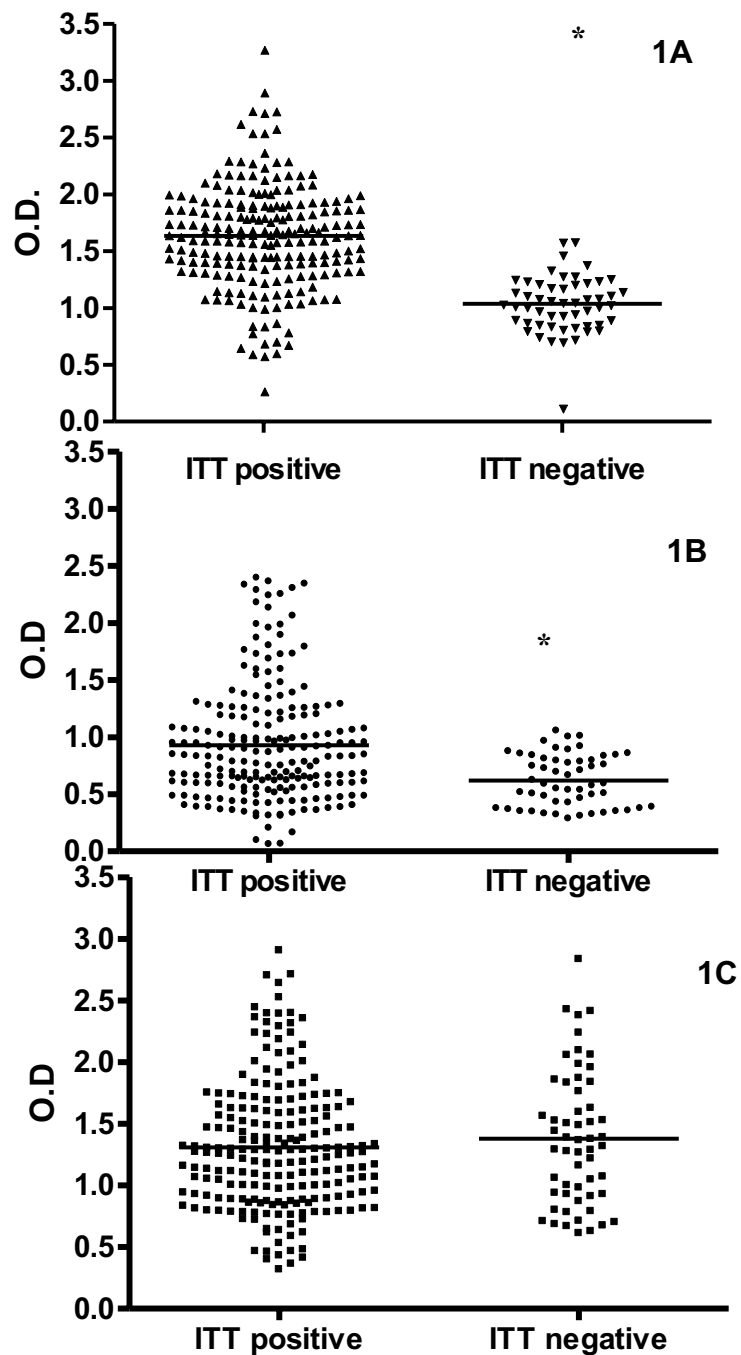


Figure 1. Serum levels of IgG anti-BCG (1A), anti-Ag85 (1B) and anti-MPT-51 (1C) from ITT positive and ITT negative bovines from Goiás and Federal District, Brazil. * $p < 0.05$.

CAPÍTULO 3- Bovinos tuberculosos, naturalmente infectados, apresentam células TCD4⁺IL-4⁺ específicas preservando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos

RESUMO

A função das células TCD4⁺IL-4⁺ e TCD8⁺IL4⁺ na resposta imune dos bovinos com tuberculose ainda não está totalmente esclarecida. Sabe-se que a IL-4 diminui a eficácia da resposta Th1, através da diminuição da expressão de óxido nítrico sintetase e ativação de macrófagos. O objetivo desse trabalho foi correlacionar o estado clínico do animal, a positividade ao teste intradérmico, com a produção específica de IL-4 por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, e a produção de óxido nítrico por macrófagos do sangue periférico de bovinos naturalmente infectados com tuberculose. Para a realização deste estudo, avaliou-se animais tuberculino positivos e negativos. A partir de PBMC isolaram-se as células mononucleares e se ajustou a uma concentração de 2×10^5 por orifício para avaliar os linfócitos TCD4 e TCD8 positivos para IL-4 e 10^6 para avaliar a produção de NO. As células CD4⁺IL-4⁺ apresentaram resposta específica para extrato protéico de *M. bovis*-BCG. Foram observados níveis basais altos de linfócitos TCD8⁺IL-4⁺ independente de estímulos nos animais reagentes. Os animais controles produziram mais NO ($7,19 \pm 3,26 \mu\text{mol/L}$) quando as células mononucleares foram estimuladas com tuberculina do que os animais tuberculino positivos ($6,27 \pm 3,54 \mu\text{mol/L}$). Quando as culturas foram estimuladas com extrato protéico de BCG não houve diferença quanto à produção de NO entre os reagentes ($8,43 \pm 7,12 \mu\text{mol/L}$) e os controles ($7,53 \pm 4,32 \mu\text{mol/L}$). Os bovinos tuberculosos, naturalmente infectados, apresentaram células TCD4⁺IL-4⁺ específicas para *M. bovis*-BCG preservando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

Palavras-Chave: *Mycobacterium bovis*, Células mononucleares, óxido nítrico, IL-4, linfócitos T, bovinos

ABSTRACT

The function of CD4⁺IL-4⁺ and CD8⁺IL4⁺ T cells in the bovine tuberculosis immune response has not been fully clarified yet. It is known that IL-4 reduces the effectiveness of the Th1 response, by reducing nitric oxide synthase expression and macrophages activation. The aim of this study was to correlate the animal clinical condition, the positivity of the intradermal tuberculin test (ITT), with the specific production of IL-4 by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and nitric oxide production by peripheral blood macrophages from cattle naturally infected with tuberculosis. For this purpose, tuberculin test positive and negative animals were evaluated. The isolated mononuclear cells were prepared from PBMC, and it was adjusted to a concentration of 2×10^5 per well to evaluate the TCD4 and TCD8 lymphocytes positive for IL-4 and 10^6 per well to evaluate the NO production. The CD4⁺IL-4⁺ cells showed specific response to protein extract of *M. bovis* - BCG. High background levels of CD8⁺IL-4⁺ lymphocytes were observed in positive ITT without any stimuli. Control animals produced more NO when mononuclear cells were stimulated with tuberculin ($7,19 \pm 3,26 \mu\text{mol/L}$) than the positive ITT group ($6,27 \pm 3,54 \mu\text{mol/L}$). When the cultures were stimulated with BCG protein extract, there was no difference in the NO production, among tuberculin positive ($8,43 \pm 7,12 \mu\text{mol/L}$) and tuberculin negative ($7,53 \pm 4,32 \mu\text{mol/L}$) groups. The naturally group showed CD4⁺IL-4⁺ specific cells to *M. bovis* - BCG, preserving the nitric oxide production by macrophages.

Key-words: mononuclear cells, nitric oxide, bovine

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma enfermidade crônica dos bovinos, causada pelo *Mycobacterium bovis*, que é caracterizada por lesões granulomatosas associadas principalmente ao trato respiratório e aos linfonodos (NEILL et al., 1994). Avalia-se que mais de 50 milhões de bovinos ao redor do mundo estejam infectados por *M. bovis*, o que resulta em uma perda econômica aproximada em U\$ 50 bilhões.

A interleucina 4 (IL-4) é produzida principalmente por células TCD4⁺ cujas funções incluem a indução da diferenciação de linfócitos TCD4 para Th2, estimulação da produção de anticorpos e supressão da função de macrófagos IFN- γ dependente (YONG et al., 1989; BOGDAN et al., 1994; GORDON et al., 2003).

Na tuberculose a IL-4, além de induzir à polarização de subpopulações de células T, está associada com o desenvolvimento e progressão da doença (HUYGEN et al., 1992). Acredita-se que essa citocina se opõe as funções protetoras do IFN- γ na tuberculose (FLYN et al., 1993). Em bovinos infectados experimentalmente com *M. bovis*, observa-se resposta celular específica para o derivado protéico purificado (PPD) com alta produção de IL-4 (RHODES et al., 2000).

A contenção da tuberculose a partir de anticorpos é controversa (TEITELBAUM et al., 1998; GLATMAN-FREEDMAN et al., 1998). Entretanto, sabe-se que a IL-4 além de atuar elevando a produção de anticorpos, diminui a eficácia da resposta Th1, através da redução da expressão de óxido nítrico sintetase e da ativação de macrófagos, levando a uma forma alternativa de ativação desses fagócitos, com diminuída eficácia anti-microbiana (BOGDAN et al., 1994; GORDON et al., 2003).

Apesar da redução da atividade anti-microbiana ser associada a progressão da infecção, a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias auxiliam na redução das lesões pulmonares o que possivelmente contribui para a manutenção do estado subclínico de alguns animais. O objetivo desse trabalho foi tentar correlacionar o estado clínico do animal, a positividade ao teste intradérmico, com a produção específica de IL-4 por

linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, e a produção de óxido nítrico por macrófagos do sangue periférico de bovinos naturalmente infectados com tuberculose.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de Estudo

Os animais que fizeram parte deste experimento foram notificados pelo veterinário credenciado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e devidamente comunicados à AGRODEFESA-GO. Todos os bovinos eram fêmeas, com idade variando entre 29 e 84 meses e com aptidão leiteira, sendo a maioria holandesa preta e branca. Todas já haviam parido pelo menos uma vez e estavam em fase de lactação. O diagnóstico foi obtido pelo teste intradérmico comparativo utilizando PPD-M e PPD-A. Consideraram-se animais positivos para tuberculose aqueles cuja diferença das leituras entre PPD-M e PPD-A foi maior ou igual a 4 mm. Após o diagnóstico os animais foram submetidos ao abate sanitário, obedecendo portanto as normas de biosegurança e nesta ocasião observou-se a presença de lesões no trato respiratório e linfonodos adjacentes. Os dados relativos aos animais utilizados encontram-se no Quadro 1. Dentre os bovinos positivos poucos (seis animais-35%) apresentavam lesões visíveis. A maioria dos animais não apresentou lesões compatíveis com a presença de tuberculose (Quadro 1). Nenhum dos animais apresentava sinais e sintomas de tuberculose.

IL-4

A população de estudo composta de bovinos fêmeas, adultas, foi dividida em dois grupos experimentais: Grupo 1 (GI) apresentaram quatro bovinos reagentes ao teste de tuberculinização intradérmico que apresentaram lesões granulomatosas caseificadas ou nos pulmões ou nos linfonodos cervicais; e de quatro animais com características semelhantes não reagentes ao teste de tuberculina intradérmico (GII).

Produção de NO

Para a realização desse experimento foi utilizado material proveniente de 13 fêmeas bovinas, adultas, da raça Holandesa, as quais foram reagentes ao teste intradérmico de tuberculina e de seis animais fêmeas bovinas não reagentes (controle negativo).

Antígenos

O antígeno recombinante Ag85A (Rv3804c), foi produzido 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 Nº NO1-AI – 75320. O BCG (Bacilli Calmette Guerin) liofilizado foi gentilmente doado pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Coleta de Amostras

Coletaram-se 20 ml de sangue com heparina de ambos os grupos de animais pertencentes a um rebanho do Estado de Goiás. Estas amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

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

O sangue foi centrifugado nos próprios tubos de coleta por 15 minutos a 2000 rpm. Retirou-se os leucócitos com pipetas de Pasteur e as células foram transferidas para tubos Falcon de 30 mL. Posteriormente acrescentou-se 25 mL de solução salina a 0,9%, centrifugando por 15 minutos a 2000 rpm. Retirou-se o sobrenadante com pipeta de Pasteur e acrescentou-se 15 mL de tampão de lise (NH_4Cl 155mM, KHCO_3 10 mM e água para 500mL), deixando agir por 5 minutos e posteriormente completou-se para 30 ml com solução salina a 0,9%, centrifugando por 15 minutos a 2000 rpm. Após a transferência para um novo tubo de poliestireno foi adicionada salina 0,9%, e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000rpm a 4°C. Após ressuspender as células em meio RPMI completo (RPMI Medium 1640

GIBCO™ 0,15% de bicarbonato 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®). Para avaliar a função da IL-4, a concentração celular foi ajustada para 2×10^5 por orifício, após a contagem em câmara de Neubauer. Foram adicionados 200 μ l da suspensão celular em cada orifício da placa de cultura celular (Cell Wells™) com os antígenos Ag85A e BCG na concentração de 1 μ g/orifício e incubou-se em estufa 5% de CO₂ a 37°C por 96 horas. A concentração celular para a avaliação da produção de NO foi ajustada em 10^7 células/mL. As células isoladas foram estimuladas com 10 μ g/mL de BCG, 5 μ g/mL de tuberculina e incubadas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C, durante 72 horas.

Análise de IL-4 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 esta etapa foram acrescentados 200 μ l por orifício de PBS azida sódica e foram incubadas por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, as suspensões celulares foram colocadas em um microtubo constituindo o painel 1 do experimento onde foram adicionados 5 μ l de anti-CD8 PE-Cy5 (MCA 1654 PE, SEROTEC) e 5 μ l de anti-CD4 –FITC (MCA1653F, SEROTEC). Após incubação por 30 minutos a 4°C, fixaram-se as suspensões celulares com PBS paraformaldeído 0,4%; azida sódica 0,1% por 15 minutos a 4°C. Depois de centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos, 100 μ l de Perm Wash (PERMA/WASH™ Buffer 10x stock) foram adicionados a cada tubo, que foram incubados por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação a 5000rpm durante 5 minutos a 4°C, 5 μ l de anti-IL-4 (MCA2372B SEROTEC) foram adicionados e os tubos foram incubados por 30 minutos a 4°C e em seguida sendo acrescentado Perm wash 1X, centrifugando em 5000 xg por 5 minutos a 4°C. As células foram ressuspendidas em PBS com azida sódica 0.1%. As aquisições foram realizadas em citometro de fluxo (BD FACS calibur, San Jose, Califórnia) do Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás).

Produção de NO

Após 72 horas, 50 μ L de cada uma das amostras foram distribuídos em quadruplicata, em uma microplaca de 96 poços para a avaliação da concentração de NO. Avaliou-se a concentração indireta de NO nas placas, dosando-se nitrito de sódio (NaNO₂). Acrescentaram-se 50 μ L de solução de Griess (ácido fosfórico 2,5%, sulfanilamida 1% e naftil-etilenodiamina 0,1%) em cada poço da placa e após incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 595nm. Após a leitura da curva padrão, confeccionou-se a equação da reta para quantificação da concentração de NO das amostras.

Bactéria e Infecção dos macrófagos

O *M. bovis*-BCG foi gentilmente doado pelo Instituto Butantan-São Paulo, Brazil.

O *M. bovis* foi originalmente isolado de lesões de bovinos positivos para o teste de tuberculina intradérmico. O bacilo foi cultivado em meio de Stonebrink .

Os macrófagos isolados foram ajustados a uma concentração de 10⁷ células/mL e infectado com *M. bovis*-BCG ou *M. bovis* isolado das lesões dos bovinos. As bactérias foram ajustadas em densidade óptica de 0,20 e as células foram infectadas em uma concentração de 1/10, 1/100 e 1/1000.

Análise Estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4 Microsoft[®] e Microsoft[®] Excel. Utilizou-se o teste de variância (ANOVA) ou o teste *t* de student para análise dos resultados, sendo P<0,05 considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Para avaliar se os animais reagentes, porém assintomáticos, apresentavam produção de IL-4 específica quando linfócitos eram estimulados com *M. bovis* BCG e Ag85, células mononucleares do sangue periférico foram estudadas por citometria de fluxo. Quando as células dos animais reagentes a tuberculina foram comparadas às células dos não reagentes após o estímulo, observou-se que havia resposta apenas quando as células foram estimuladas com *M. bovis*- BCG (Figura 1, $p < 0,05$).

Tanto os controles negativos quanto os animais reagentes tiveram células TCD8⁺IL-4⁺ em resposta aos antígenos utilizados. No entanto, deve-se observar que estas células já se encontravam presentes, mesmo na ausência de estímulos nos animais reagentes e nos controles. Os linfócitos TCD8⁺IL-4⁺ dos animais reagentes estavam em porcentagem maior do que os dos animais controles (Figura 2, $p < 0,05$).

Como a IL-4 participa ativamente na modulação da resposta bactericida dos macrófagos, decidiu-se verificar as funções dessas células nos animais reagentes comparados aos controles. Macrófagos de bovinos positivos quando estimulados com tuberculina ou com *M. bovis*-BCG não se observou diferença entre os animais (Figura 3 e 4).

Devido à ausência de resposta diferencial satisfatória decidiu-se verificar se macrófagos de animais saudáveis respondem produzindo NO quando desafiados com *M. bovis* BCG e com *M. bovis* isolado de um dos animais infectados. A avaliação da cinética da infecção *in vitro* permitiu observar uma crescente produção de NO frente aos bacilos vivos (Figura 5).

DISCUSSÃO

A função das células TCD4⁺IL-4⁺ e de linfócitos TCD8⁺IL-4⁺ em áreas endêmicas para tuberculose bovina e humana é de difícil esclarecimento. Isso porque o padrão da resposta imune em países em desenvolvimento difere dos de países desenvolvidos (GRAHAM et al., 2006). Nestes países há maior controle sanitário, portanto a carga de parasitas

intestinais é baixa ou inexistente e insuficiente para ativar uma resposta imune do tipo Th2. Nos países em desenvolvimento a freqüente exposição dos animais a helmintos faz com que haja uma constante resposta imune do tipo Th2 (BROWN et al., 1994), obscurecendo dessa forma o real papel da IL-4 na resposta à tuberculose. Em humanos a função da IL-4 tem sido estudada por ORDWAY et al. (2005) quanto à susceptibilidade dos pacientes e contatos em desenvolverem a tuberculose ativa. Parece haver uma correlação entre a presença de IL-4 nas células T, no início da resposta, que resultam em aumento da susceptibilidade dos contatos em desenvolver doença clínica. Este quadro na resposta imune dos trabalhadores que desenvolveram tuberculose foi detectado anos antes do surgimento da doença, sugerindo ser um indicador da susceptibilidade a tuberculose. Esse parâmetro de comparação pode também ser utilizado para avaliar o papel da IL-4 em animais reativos ao TTI em áreas endêmicas para tuberculose, uma vez que em países onde a tuberculose é controlada, sabe-se que a progressão de lesões causadas pelo bacilo está relacionada à diminuição da IL-4⁵³, um agonista da IL-4 (RHODES et al., 2007).

Apesar da IL-4 estar relacionada à produção de anticorpos (HUYGEN et al., 1992; HOWARD et al., 1999; DHEDA et al., 2005), observou-se que os animais de ambos os grupos (reagentes e não reagentes), apresentaram níveis elevados de IgG específicos para o BCG não estando portanto esta citocina, neste caso, correlacionada somente a produção de anticorpos (dados não apresentados).

Neste estudo, a resposta dos linfócitos TCD8⁺IL-4⁺ e TCD8+IL-4+ foi independente da presença de lesão. Entretanto, os linfócitos TCD4⁺IL-4⁺ responderam especificamente ao *M. bovis*-BCG, no grupo reagente ao teste de tuberculina, apresentando resposta imune foi maior, independente do estímulo, quando comparada ao grupo controle. Apesar de outros trabalhos terem comprovado a presença de IL-4 em casos de tuberculose (VAN CREVEL, 2000; SMITH, 2002), os resultados apresentados aqui demonstram que células TCD8 também podem ser estimuladas para produzirem IL-4. Além do mais, os níveis basais de células TCD8⁺IL-4⁺ no sangue periférico de bovinos positivos é o dobro do que os dos animais negativos. WATERS et al.,

(2003) comprovaram que a progressão da doença, leva a diminuição da concentração do NO. Talvez este fato possa estar associado ao aumento da concentração da IL-4 (BOGDAN et al., 1994; GORDON et al., 2003).

A IL-4 leva uma ativação alternativa dos macrófagos, que causa uma diminuição do poder microbicida desta célula. Neste trabalho tanto nos animais tuberculose positivos quanto no controle não demonstrou diferença quanto à produção de NO. Geralmente os macrófagos quando estimulados com IFN- γ antes de serem infectados com BCG produzem altos níveis de NO, no entanto se os macrófagos forem diretamente infectados, a produção de NO é reduzida provavelmente culminando com um baixo poder microbicida (DENIS et al., 2005; CARPENTER et al., 1998). Nossos resultados, no entanto, utilizaram extrato protéico total que contém diversas moléculas capazes de induzir a ativação de macrófagos via Toll like receptors (por exemplo: mananas aderidas às proteínas) gerando a produção de NO independente da origem destas células se de animais positivos ou negativos.

Quando macrófagos de animais saudáveis foram infectados com *M. bovis* de rua (provenientes de um dos animais positivos), houve uma produção de $24,14 \pm 5,37$ de NO quando os macrófagos foram infectados com *M. bovis* e $18,74 \pm 6,32$ quando infectado com *M.bovis*-BCG (Figura 5). Esses resultados podem inferir numa possível maior virulência do *M. bovis* recém isolado quando comparado com o *M. bovis*-BCG. Se compararmos inadvertidamente, esse resultado, com os dados dos animais infectados, estimulados com extrato protéico, observamos uma produção elevada de NO por macrófagos saudáveis e infectados com *M. bovis* e *M.bovis*-BCG do que por macrófagos de animais positivos (Figuras 3-5). Poderia se inferir que os macrófagos dos animais infectados encontram-se debilitados ou incapazes de produzir NO.

Este trabalho, no entanto, não esclareceu se os macrófagos de animais com tuberculose ativa sejam eles provenientes de animais com lesões ou não, apresentam resposta reduzida quando infectados por *M. bovis* -BCG ou *M. bovis* de rua. Trabalhos futuros que elucidem estas questões, além do papel de outras citocinas que podem ter influenciado direta ou indiretamente nesses resultados, poderão explicar melhor a questão.

CONCLUSÃO

Os bovinos tuberculosos, naturalmente infectados, apresentaram células TCD4⁺IL-4⁺ específicas para *M. bovis*-BCG preservando a produção de óxido nítrico pelos macrófagos pois a produção de NO por macrófagos do sangue periférico é semelhante entre estes e aqueles se estimulados com extrato protéico.

REFERÊNCIA

1. BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; PAIK, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthases expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.55, n.2, p.227-233, 1994.
2. BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; DOBBELAERE, D.A.E. RICE-FICHT. A.C. CD4⁺ T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 profiles. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, p.818-827, 1994.
3. CARPENTER, E.; FRAY, L.; GORMLEY, E. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in *Mycobacterium bovis* BCG-infected bovine macrophages. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.76, n.4, p.363, 1998.
4. DENIS, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercule bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cellular Immunology**, San Diego, v.132, p.150-157, 1991.
5. DENIS, M.; WEDLOCK, D.N.; BUDDLE, B.M. IFN- γ enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v.83, n.6, p.643-648, 2005.
6. DHEDA, K.; CHANG, J. S.; BREEN, R. A. M.; JAMANDA, A.; HADDOCK, J. A.; LIPMAN, M.; KIM, L. U.; HUGGETT, J. F.; JOHNSON,

- M. A.; ROOK, G. A. W.; ZUMLA, A. Expression of a novel cytokine, IL4delta2, in HIV and HIVtuberculosis co-infection. **AIDS**, London, v.19, p.1601–1606, 2005.
7. FLYNN, J. L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; BLOOM, B.R. An essential role for Interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.178, p.2249-2254, 1993.
 8. GLATMAN-FREEDMAN, A.; CASADEVALL, A. Serum therapy for tuberculosis revisited: a reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, p.514–532, 1998.
 9. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews Immunology**, New York, v.3, n.1, p.23-35. 2003.
 10. GRAHAM, A.W.R.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. Immune systems in developed and developing countries; implications for the design of vaccines that will work where BCG does not. **Tuberculosis**, Edinburg, v.86, p.152-162, 2006.
 11. HOWARD, A.D.; ZWILLING, B.S. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.115, p.428–434, 1999.
 12. HUYGEN, K., ABRAMOVICZ, D.; VANDENBUSSCHE, P.; JACOBS, F.; DEBRUYN, J.; KENTOS, A.; DROWART, A.; VAN VOORNEN, J.-P.; GOLDMAN, M. Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, p.2880–2886, 1992.
 13. LONG, R.; LIGHT, B.; TALBOT, J.A. Mycobacteriocidal Action of Exogenous Nitric Oxide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.43, p.403-405, 1999.

14. LUONI, G.; VERRA, F.; ARCA, B.; SIRIMA, B.S.; TROYE-BLOMBERG, M.; COLUZZI, M. Antimalarial antibody levels and IL-4 polymorphism in the Fulani of West Africa. **Genes and Immunology**, v.2, p. 411-4, 2001.
15. NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.41-52, 1994.
16. ORDWAY, D.J.; MARTINS, M.S.; COSTA, L.M.; FREIRE, M.S.; ARROZ, M.J.; DOCKRELL, H.M.; VENTURA, F.A. Increased IL-4 production in response to virulent *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients with advanced disease. **Acta Medica de Portugal**, Lisboa, v.18, n.1, p.27-36, 2005.
17. RHODES, S.G. SAWYER, J.; WHELAN, A.O.; DEAN, G.S.; COAD, M.; EWER, K.J.; WALDVOGEL, A.S.; ZAKHER, A.; CLIFFORD, D. J.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. Is Interleukin-4⁵³ Splice Variant Expression in Bovine Tuberculosis a Marker of Protective Immunity? **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, N. 6, p. 3006-3013, 2007.
18. RHODES, S.G.; PALMER, N.; GRAHAM, S.P.; BIANCO, A.E.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIR, H.M. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.9, p.5393-5400, 2000.
19. SMITH, S.M.; KLEIN, M.R.; MALIN, A.S.; SILLAH, J.; MCADAM, K.P.; DOCKRELL, H.M. Decreased IFN- gamma and increased IL-4 production by human CD8⁽⁺⁾ T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients. **Tuberculosis**, Edinburg, v.82, n.1, p.7-13, 2002.
20. TEITELBAUM, R.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; CHEN, B.; ROBBINS, J.B.; UNANUE, E.; CASADEVALL, A.; BLOOM, B.R. A monoclonal antibody recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. **Proceedings of the National Academy of**

- Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.15688–15693, 1998.
21. VAN CREVEL, R., E. KARYADI, F. PREYERS, M. LEENDERS, B. J. KULLBERG, R. H. H. NELWAN, AND J. W. M. VAN DER MEER. Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.181, p.1194-1197, 2000.
 22. WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; SACCO, R.E.; WHIPPLE, D.L. Nitric oxide production as an indication of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus Virginiaunus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.38, n.2, p.338-343, 2003.
 23. YONG, A.J.; GRANGE, J.M.; TEE, R.D.; BECK, J.S.; BOTHAMLEY, G.H.; KEMENY, D.M.; KARDJITO, T. Total and anti-mycobacterial IgE levels in serum from patients with tuberculosis and leprosy. **Tubercle**, Edinburg, v.70, n.4, p.273-9, 1989.

QUADRO 1: Distribuição dos animais tuberculose positivos. Características gerais do histórico clínico.

Idade do Animal (meses)	Sexo	Raça	Teste de tuberculina intradérmico (mm) ^a (PPD-M-PPD-A)	Lesões ^b
60	F	Holandês (PC)	5,7-0,4	linfonodo subescapular e pulmão
52	F	Holandês (PC)	4,5-0,2	linfonodo subescapular
67	F	Holandês (PC)	8,8-1,0	Sem lesão visível
29	F	Holandês (PC)	9,3-1,2	Sem lesão visível
41	F	Holandês (PC)	12,1-4,8	linfonodo subescapular
56	F	Holandês (PC)	7,0-2,5	Sem lesão visível
43	F	Holandês (PC)	7,2-0,8	Sem lesão visível
40	F	Holandês (PC)	6,9-0,4	Sem lesão visível
38	F	Holandês (PC)	8,5-2,2	Sem lesão visível
58	F	Holandês (PC)	17,9-7,9	Sem lesão visível
67	F	Holandês (PC)	8,6-1,0	Sem lesão visível
50	F	Holandês (PC)	8,4-0	Sem lesão visível
55	F	Mestiço-Holandês	9,9-2,6	Lesão no pulmão e linfonodo subescapular e
84	F	Mestiço-Holandês	4,9-0,2	Extensiva aos pulmões, linfonodos submandibulares e retrofaríngeo
32	F	Mestiço-Holandês	5,3-0,6	linfonodo subescapular
56	F	Mestiço-Holandês	7,0-2,0	Sem lesão visível
38	F	Mestiço-Holandês	12,6-1,6	Sem lesão visível

^a Teste intradérmico comparativo entre PPD de *M. bovis* e PPD de *M. avium*.

^b Lesões granulomatosas caseosas, purulentas.

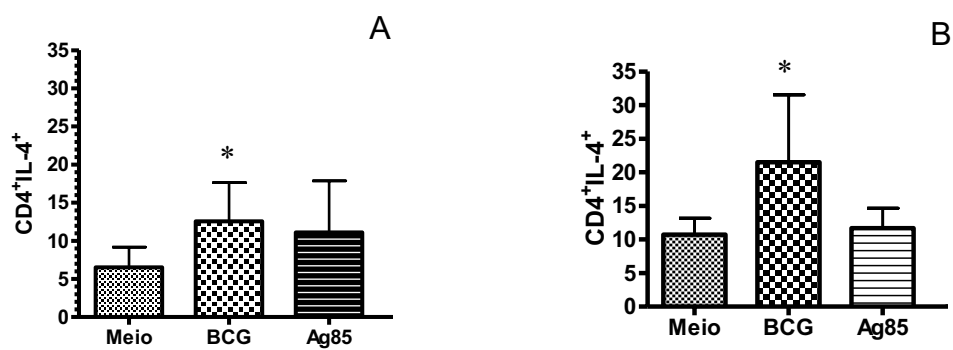


Figura 1: Porcentagem de células TCD4⁺IL-4⁺ estimuladas *in vitro* com BCG e antígeno recombinante Ag 85 . **A** controle negativo ao teste de tuberculina intradérmico. **B.** bovinos positivos ao teste de tuberculina intradérmico.

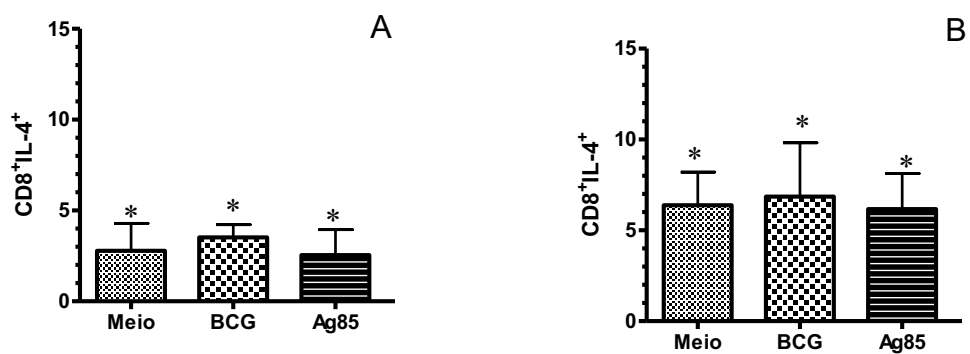


Figura 2: Porcentagem de células TCD8⁺IL-4⁺ estimuladas *in vitro* com BCG e antígeno recombinante Ag 85. **A** controle negativo ao teste de tuberculina intradérmico. **B.** bovinos positivos ao teste de tuberculina intradérmico.

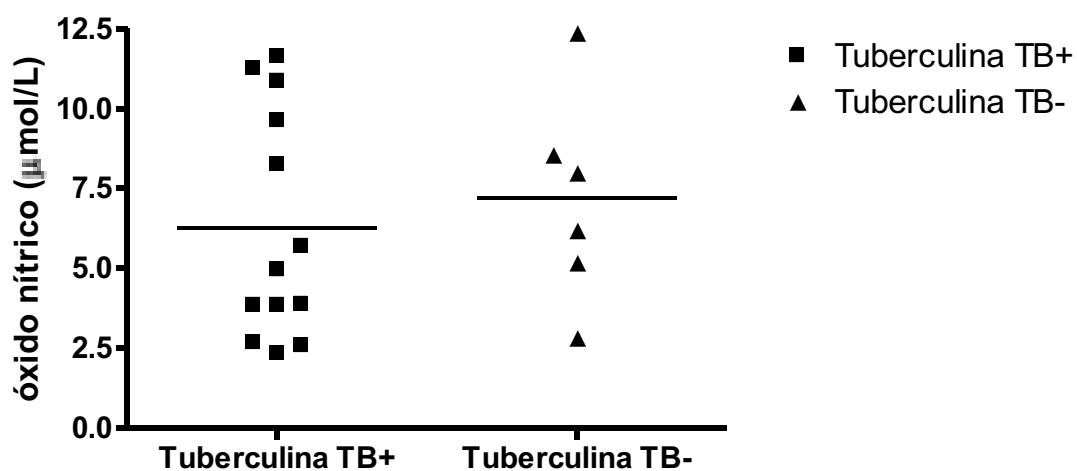


Figura 3. Distribuição da concentração de óxido nítrico, em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos e negativos para tuberculose, estimulados com tuberculina (PPD bovis), oriundos do Estado de Goiás, agosto de 2006.

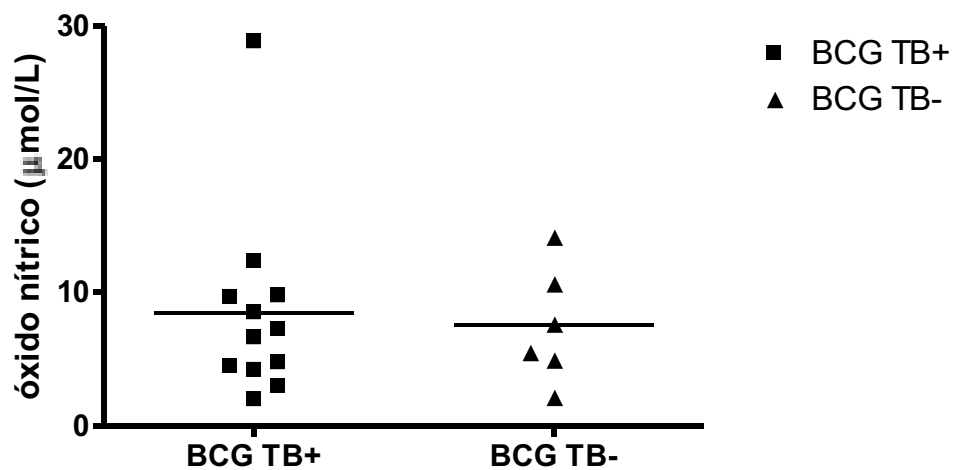


Figura 4. Distribuição da concentração de óxido nítrico, em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de bovinos positivos e negativos para tuberculose, estimulados com BCG, oriundos do Estado de Goiás, agosto de 2006.

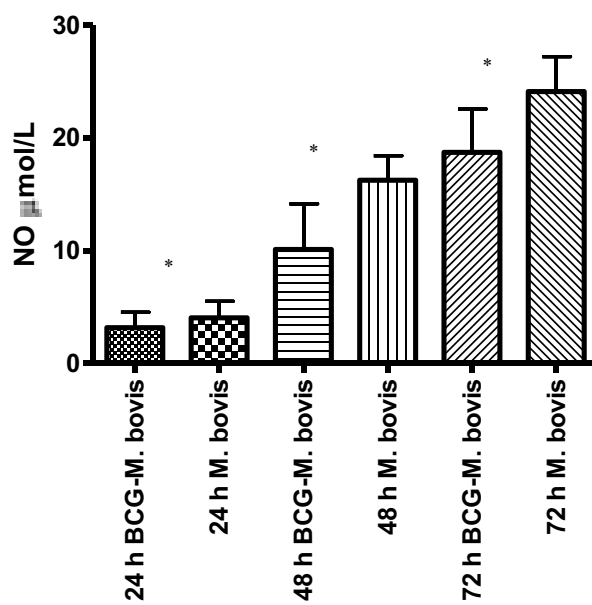


Figura 5. Distribuição da concentração de óxido nítrico, em macrófagos infectados com BCG-*M. bovis* e *M. bovis*, isolado de lesões de linfonodos de bovinos TTI positivo, oriundos do Estado de Goiás, agosto de 2006.

CAPÍTULO 4- Eficácia do antígeno MPT-51 recombinante na vacinação contra *Mycobacterium tuberculosis*

Running title:

Proteção do MPT-51 na infecção com *Mycobacterium tuberculosis*.

Resumo

O antígeno rMPT-51 foi avaliado como vacina de subunidade protéica, na infecção experimental de camundongos BALB/c com *M. tuberculosis*. Utilizou-se r-MPT-51 combinado ou não com Adjuvante de Freund Incompleto e CpG DNA. Na presença dos adjuvantes, houve aumento de células TCD5⁺IFN- γ ⁺ específicas no baço e no linfonodo drenante. O desafio com *M. tuberculosis* (2×10^5 CFU, via intra-traqueal), induziu aumento de células TCD5⁺IFN- γ ⁺ específicas no baço e pulmão, e a imunização e o desafio dobrou a quantidade dessas células apenas no pulmão. A vacina contendo CpG DNA, além de diminuir a carga bacteriana no pulmão, apresentou menor número de lesões granulomatosas.

Palavras-Chave: Tuberculose, Antígeno recombinante, Proteção.

1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa grave que constitui um dos maiores problemas de saúde pública. Causa aproximadamente oito milhões de novos casos a cada ano e destes, aproximadamente 2 milhões de pessoas morrem no mundo todo [1]. Cerca de um terço da população mundial está infectada com o bacilo causador da TB, o *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente, é a principal causa de morte em indivíduos infectados com o vírus da AIDS (HIV) [2, 3].

Desde 1921, a vacina utilizada na prevenção da tuberculose é a BCG (*Mycobacterium bovis* - Bacillus Calmette-Guérin), de bactéria viva, porém atenuada. Não há dúvidas de que a BCG protege contra formas graves de tuberculose na infância, entretanto, devido à variação da sua eficácia não existe consenso quanto ao seu efeito protetor em países endêmicos [4-8]. Além disso, a eficiência da BCG na prevenção da TB em indivíduos infectados com o HIV é incerta, pois já ocorreram casos de reativação em indivíduos imunocomprometidos [9].

Diante dos sérios problemas enfrentados com a BCG é necessário o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a TB sem causar riscos de infecção em pessoas imunocomprometidas [7, 2]. Diferentes estratégias de vacinação já se encontram em teste de fase 1. Essas tentativas incluem: vacina com BCG modificado [10, 11] vacina de DNA [12, 13] e vacinas de subunidades [14-16]. No entanto, nenhuma das vacinas propostas foi capaz de sobrepujar a proteção da BCG na infecção experimental [17, 18].

A proteína MPT-51 (Rv3803c, 27 kDa) do *M. tuberculosis*, liga-se à fibronectina componente do estroma extracelular, podendo, portanto estar envolvida na virulência do bacilo, especialmente no período inicial da infecção [19, 20]. Além disso, o MPT-51 é imunogênico e específico ao ser reconhecido por anticorpos do hospedeiro [21- 24].

Neste trabalho avaliamos a eficácia do MPT-51 como vacina na prevenção da infecção dos camundongos Balb/C com *M. tuberculosis*.

2. Material e Métodos

Antígeno recombinante

Os plasmídeos foram introduzidos em células de *E.coli* BL-21 (DE3) por eletroporação. As *E.coli* transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (20 mg/ml) e cloranfenicol (10mg/ml) e incubadas por dezoito (18) horas em estufa a 37⁰C para crescimento. As células transformadas foram então repicadas em 500 ml de caldo LB acrescido de ampicilina e cloranfenicol, usando as mesmas concentrações anteriores, e incubadas em shaker a 37⁰C. Quando atingiu-se a densidade ótica de 0,6 (OD₆₀₀) foi acrescentado IPTG 100 mM e incubado por mais 4 horas no shaker a 37⁰C. As células induzidas foram colhidas por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4⁰C. O pellet da cultura contendo as proteínas recombinantes foi ressuspensão e as células foram lisadas em aparelho de lise mecânica por pressão negativa (French press Cell rating). Esta solução foi purificada em coluna de níquel sefarose (ÄKTA prime, GEHealthCare) e as frações analisadas em gel SDS-PAGE. A concentração das proteínas foi determinada através do Método de Bradford (Protein Assay Kit II – BioAgency).

Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, com idade entre dois e três meses. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG. Os animais infectados com *M. tuberculosis* foram mantidos no Laboratório de Biotecnologia (nível III) no Instituto Butantan - SP. Todos os animais foram mantidos de acordo com as normas de conduta e ética do Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Sentinelas foram mantidas para garantir a integridade microbiológica dos animais testados.

Vacinação e desafio

Os camundongos (n=24), foram divididos em três grupos com 8 animais cada, sendo G1= 100 μ L salina; G2=100 μ L MTP51 20 μ g/mL + Adjuvante Incompleto de Freund (AIF); G3=100 μ L MPT51 20 μ g/mL + CpGDNA. Os animais foram imunizados três vezes pela via subcutânea, com intervalo de 15 dias. Trinta dias após o final da imunização, 15 camundongos foram desafiados com 2×10^5 CFU de *M. tuberculosis* (H37RV) pela via intratraqueal. O inóculo foi plaqueado em meio 7H11 com OADC e as colônias foram contadas 21 dias após a incubação a 37°C para confirmação.

Cultura celular do baço, do linfonodo

Trinta dias após a imunização, três animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara de CO₂, para a análise da resposta imune específica. O baço e o linfonodo poplíteo (drenante) foram assepticamente removidos. Para obtenção de uma suspensão celular, os órgãos foram individualmente

submetidos à pressão em uma peneira de poliestireno de 70 μ m com auxílio de um êmbolo. As suspensões celulares assim obtidas foram ressuspensas em meio de cultura completo – cRPMI (RPMI Medium 1640 GIBCO™ 0,15% de bicarbonato 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®). 2x10⁶ células/ml foram distribuídas em placas de cultura celular de 24 orifícios (FALCON® e Multiwell™) e solução de rMPT-51 (20 μ g/mL) foi adicionada nos poços correspondentes. Após 6 horas de incubação a 37°C a 5% de CO₂ foi adicionado solução de monensina (3 μ M) diluída em cRPMI, permanecendo nesta condição durante quatro horas. Após esse período as células foram recuperadas para ensaios posteriores.

Pulmões

Trinta dias após o desafio, 12 camundongos foram eutanasiados, extraído-se o baço e o pulmão de cada animal. As células do baço receberam o mesmo tratamento da etapa anterior. O sangue dos pulmões foi retirado injetando-se 5ml no ventrículo direito de uma solução de PBS contendo heparina (50U/ml - Sigma, St Louis, MO). Os pulmões foram removidos assepticamente e os lobos pulmonares foram separados: os lóbulos esquerdo superior e médio foram processados para análise histológica. O lóbulo esquerdo inferior foi transferido para um tubo contendo 1ml de iRPMI para posterior obtenção da CFU. Os lóbulos direito e acessório foram transferidos para tubos plásticos contendo 1ml de iRPMI para obtenção de suspensão celular. Para obtenção da suspensão celular os lóbulos direito e acessório

foram tratados com solução de Deoxyribonuclease IV (DNAse) (Sigma Chemical, 30 μ g/ml) e Colagenase XI (Sigma Chemical, 0,7mg/ml) para digerir a 37°C por 30 minutos. Após o procedimento da digestão, os pulmões foram individualmente submetidos à pressão em uma peneira de poliestireno de 70 μ m com auxílio de um êmbolo. Posteriormente, submeteu a suspensão celular dos pulmões a tratamento com tampão de lise (0,15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃) para eliminação da hemácias e após centrifugação a 1000rpm durante 5 minutos, as células foram ressuspensas em cRPMI, cultivadas e tratadas para posterior marcação celular.

Marcação dos antígenos de superfície e citocinas intracelulares

Após a cultura, adicionou-se PBS Azida Sódica nas células. Posteriormente, as células foram transferidas para placa de poliestireno de 96 orifícios, de acordo com os painéis de anticorpos previamente estabelecidos. Uma solução de anticorpos monoclonais contendo PE-CD44, APC-CD62L, PERCP-CD5 foram diluídos em PBS azida sódica. Após fixação com paraformaldeído e lavagem com saponina (Perm wash), foi adicionada uma solução de FITC-anti-IFN- γ (5mg/mL) em Perm wash. Todos os anticorpos foram comprados da BD Pharmingen e usados na concentração de 0,2 μ g/10⁶ células. No final as suspensões celulares foram ressuspensas em PBS azida sódica e foram analisadas em citometro de fluxo (BD FACS CALIBUR, San Jose, Califórnia, Hospital Araújo Jorge).

Determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Um dia após o desafio dos camundongos, um animal de cada um dos grupos foi eutanasiado, coletando-se o pulmão para avaliar se a quantidade ideal de bacilos viáveis chegaram ao órgão. Cada lóbulo foi macerado em um homogeneizador contendo meio de cultura da coleta (1mL de iRPMI) e de cada amostra foi retirada uma alíquota de 100µL que foi plaqueada em placas de petri contendo 25mL meio de cultura (Meio Mycobacteria 7H11 Ágar DIFCO). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, para posterior contagem das colônias de micobactérias.

ELISA

Antes da necropsia dos camundongos, foram retirados pelo plexo venoso retro orbital cerca de 700µl de sangue. Os soros obtidos foram submetidos ao teste sorológico de ELISA, para avaliar a produção de anticorpos. Sucintamente, os poços das placas foram adsorvidos com o antígeno rMPT-51 a 2,5µg/ml em tampão carbonato, pH 9,6. O bloqueio foi feito com solução de carbonato-bicarbonato com leite em pó desnatado a 1% e os soros foram diluídos (1/100) em solução de PBS, leite desnatado a 0,05%. Os conjugados (Goat anti-mouse IgG1–Biot, Southern Biotechnology) e (Goat anti-mouse IgG2a – Biot,) diluídos a 1/5000 em PBS, (0,05% de leite desnatado, Tween 20 0,05%) foram adicionados às placas e incubados por 1 hora a 37°C. Estreptoavidina conjugada com peroxidase (ExtrAvidin^R Sigma Peroxidase Conjugate) foi utilizada a 1/1000 em PBS, leite desnatado a 0,05%, Tween 20. O tampão substrato consistiu em OPD (5mg/ml) e H₂O₂ (20µL/30V) diluídos em tampão citrato-fosfato, pH 4,5. Ácido sulfúrico a 4N foi usado para

parar a reação e a densidade óptica (DO) foi mensurada na leitora de ELISA (Thermo Labsystems Multiskan) usando comprimento de onda de 492nm.

Histologia

Os lóbulos pulmonares: esquerdo superior e o médio dos camundongos imunizados com antígeno MPT-51 e desafiados com *M. tuberculosis*, foram processados de acordo com a técnica descrita por [25]. O processamento histológico das amostras foi realizado no Laboratório de Patologia Geral do IPTSP. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscopia óptica de campo claro.

Análise Estatística

A análise da citometria de fluxo foi feita utilizando o programa Cytomation Summit. A variância das amostras foi determinada por ANOVA e o teste T *student* foi usado para comparar os grupos estudados. Considerou-se um $p < 0,05$ como diferença estatística significativa.

3. Resultados

Indução de memória Imunológica

Avaliou-se a resposta imune específica ao antígeno MPT-51 dos camundongos BALB/c imunizados. A imunização com antígeno rMPT-51 utilizando o AIF ($10,34 \pm 6,8$) e CpG DNA ($10,55 \pm 6,07$), induziram um aumento de células TCD5⁺IFN- γ ⁺ no baço quando comparados com o grupo controle ($3,49 \pm 0,75$) (Figura 1 e 2A). Somente quando foi utilizado como

adjuvante CpG DNA houve presença células TCD5⁺IFN- γ ⁺ no linfonodo drenante ($4,55 \pm 1,50$; Figura 2B), ($p < 0,05$).

Quanto a resposta imune humoral, observou-se que somente o grupo imunizado com antígeno rMPT-51 e AIF apresentou níveis séricos de anticorpos tanto da classe IgG2a ($2,29 \pm 0,009$; Figura 2C) quanto da classe IgG1 ($2,57 \pm 0,07$; Figura D) específicas para o MPT-51.

Análise da Proteção

Como esperado, a infecção induz células TCD5⁺IFN- γ ⁺ específicas para o MPT-51 (baço= $1,69 \pm 0,23$; pulmão= $2,45 \pm 0,40$). A imunização com rMPT-51 e AIF (Figura 3A e B; $p < 0,05$) potencializa esta resposta tanto no baço ($2,47 \pm 0,36$) quanto no pulmão ($3,95 \pm 0,68$). Já a imunização com rMPT-51 e CpG DNA gera resposta preferencialmente pulmonar ($5,41 \pm 1,26$; Figura 3B; $p < 0,05$).

Na resposta imune humoral, trinta dias após a infecção, observou-se que o desafio não induz resposta imune específica detectável para o rMPT-51. Nos animais imunizados, apesar da baixa concentração sérica de imunoglobulinas específicas em todos os grupos, aqueles vacinados com antígeno rMPT-51 e AIF, apresentaram níveis séricos maiores de anticorpos da classe IgG2a ($0,57 \pm 0,03$) e IgG1 ($0,545 \pm 0,012$) que os controles (Figura 3C e D).

Na avaliação histológica do pulmão, observou-se hiperplasia do epitélio colunar com inflamação perivascular proeminente nos animais somente infectados (Fig. 4A e B) e nos animais imunizados com rMPT-51 e AIF e desafiados com *M. tuberculosis* (Fig. 4C e D). No entanto, observou-se tecido

pulmonar íntegro com poucas células inflamatórias nos animais vacinados com MPT-51 e CpG DNA (Fig. 4E e F).

Na contagem das CFU nos pulmões, realizada 60 dias após a infecção, observou-se uma redução da carga bacteriana no grupo imunizado com antígeno rMPT-51 e CpG DNA ($\log_{10} = 3,75$) comparado com o controle ($\log_{10} = 5,45$) ($p < 0,05$), (Figura 5).

4. Discussão

A variabilidade da proteção da vacina BCG leva a uma constante busca por uma imunização mais eficaz. O desafio para tal propósito é encontrar antígenos altamente imunogênicos e, portanto que sejam capazes de induzir uma resposta celular (Th1) e humoral (Th2) mais potente e competente na contenção da infecção pelo *M. tuberculosis* [26].

O MPT-51 é um antígeno protéico recombinante, codificado na região FbpC1 adjacente ao gene FbpA do *M. tuberculosis* [27], *M. leprae* [28], *M. avium* [29], e *M. bovis* BCG [30]. A proteína é secretada em condições de estresse, o que mimetiza as condições de adesão, sobrevivência aos fagócitos do hospedeiro e adaptação ao ambiente [31]. O MPT-51 é considerado um antígeno imunogênico [32], uma vez que é reconhecido por anticorpos séricos da classe IgM provenientes de pacientes com tuberculose ativa, sendo capaz de discriminar estes indivíduos de controles saudáveis [24]. Esta característica também pode ser comprovada nos experimentos demonstrados neste trabalho, pois utilizando diferentes estratégias de imunização, o rMPT-51 foi capaz de induzir células TCD5⁺IFN- γ ⁺ e anticorpos específicos.

O CpG DNA é reconhecido através do TLR-9 [33] que dependem diretamente do MYD88 para transdução do sinal [34]. Após a exposição ao CpG DNA, as células B, macrófagos e/ou células dendríticas aumentam os níveis de reativos de oxigênio [35] e a expressão de i-NOS nos macrófagos [36]. Há a ativação do NFκB [37] e da proteína quinase (MAPK) [38, 39] para a produção de citocinas do tipo Th1 tais como: IL-12 e IL-18 e INF-γ pelas NK, promovendo a diferenciação em Th1 [40-42]. Sabe-se que o IFA é capaz de estimular a resposta imune inata além de induzir a expressão de citocinas, especialmente o TNF-α [43]. No entanto, a sua atual formulação causa inflamação muito severa no local da aplicação. Em modelos animais, essa característica não é um fator limitante para a sua utilização, no entanto, é proibido o uso em humanos, devendo-se rever a sua formulação [44]. Os adjuvantes IFA e CpG DNA, utilizados neste estudo potencializaram a resposta imune corroborando com estudos anteriores [45, 46].

Após a vacinação, avaliou-se a resposta imune celular e humoral dos animais. Observou-se que o adjuvante sozinho não induz resposta imune específica ou exacerba a proteção (dados não mostrados). Entretanto, foi detectada a presença de resposta imune celular pelo aumento significativo de células TCD5⁺IFNγ⁺ especialmente no pulmão quando se utilizou o MPT51 com CpG DNA. HSEIEH et al. (2004) não observaram o aumento da resposta imune protetora que fosse inferida a este adjuvante. No entanto, a natureza dos antígenos utilizados, no que diz respeito à persistência ou não no hospedeiro, influencia diretamente a resposta a ser induzida. O MPT-51 talvez persista por mais tempo no hospedeiro aumentando a proporção de sua apresentação em

moléculas de MHC de classe II garantindo assim uma resposta específica do tipo Th1.

Sabe-se que a resposta imune eficaz contra a tuberculose é a celular (tipo Th1), cujas citocinas produzidas, como o IFN- γ , ativa mecanismos antimicrobianos que culminam na eliminação do patógeno ou no seu isolamento, formando granuloma [47- 49]. O CpG DNA aumenta a produção de citocinas do tipo Th1. Esse fato explica a maior concentração de IFN- γ , quando utilizamos este adjuvante com o MPT-51. O que pode ser claramente demonstrado após a imunização, quando foi possível detectar anticorpos séricos da classe IgG2a específicos para o MPT-51.

A resposta imune humoral (tipo Th2) apresenta também grande importância, pois as citocinas envolvidas nessa resposta induzem à produção de anticorpos pelos linfócitos B e inibem a ativação de células, regulando a resposta imunológica [50, 51, 52]. A indução de resposta imune humoral foi detectada em maior quantidade no grupo MPT-51 que utilizou o IFA, comparado ao grupo MPT-51 com CpG DNA. Considerando que ambos os padrões de resposta imune, celular e humoral, são importantes na proteção da tuberculose [50, 51, 53], o AIF destacou-se por estimular ambas as respostas (Tanto IgG2a quanto IgG1).

Após 30 dias de infecção, os principais aspectos histológicos observados nos animais somente infectados, foram a presença de inflamação peri-arteriolar. Estes aspectos foram semelhantes aos observados em outros trabalhos, onde neste período não existe um processo inflamatório definido [54, 55, 49]. Já no grupo MPT-51/AIF houve inflamação difusa e presença de células organizadas em focos. Entretanto o grupo imunizado com MPT51/CPG

DNA houve melhor conservação do parênquima pulmonar, com menor número de lesões inflamatórias. A vacinação de camundongos BALB/c para avaliar aspectos morfológicos e de proteção à infecção por *M. tuberculosis* também foi realizada por AGULIAR et al. (2006). Neste trabalho, assim como no trabalho apresentado aqui, o camundongo BALB/c pode ser parcialmente protegido pelas vacinas formuladas.

A redução da carga bacteriana é um fator de grande relevância na avaliação de resposta protetora induzida por um determinado antígeno. Neste estudo o grupo imunizado com MPT-51/CpG DNA reduziu (quase 2 Log₁₀) a carga bacteriana quando comparado ao grupo controle e mais discretamente quando comparado ao grupo MPT-51/AIF.

Diante dos resultados positivos descritos com o antígeno MPT-51 como vacina de subunidade, o seu aperfeiçoamento traz boas expectativas quanto à descoberta de uma vacina eficaz contra a tuberculose. Os próximos passos consistem em analisar mais especificamente a resposta imune específica dos linfócitos TCD4 e TCD8, além da análise das células de memória, células efetoras desencadeada pelo esquema de vacinação com o CpG DNA.

Conclusão

O grupo imunizado com r-MPT51/CpG DNA foi capaz de estimular as células TCD5⁺IFN- γ ⁺. Além disso, este esquema de vacinação promoveu a diminuição da carga bacteriana e preservou a integridade pulmonar mesmo após a infecção. O antígeno MPT-51 é imunogênico e induz proteção podendo ser estudado no futuro como componente de vacina de subunidade protéica.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por projeto Universal do CNPq. Ediane Batista da Silva- Bolsista de Doutorado, CAPES; Michelle Cristina Guerreiro dos Reis - Bolsista de Doutorado, CNPq; Bruna Daniella de Souza Silva- Bolsista PIBIC. Ao Instituto Butantan na pessoa de Luciana Cezar de Cerqueira Leite. A Isabel Miranda por gentilmente ceder o CpG DNA.

Referências

- [1] World Health Organization. WHO REPORT 2007: Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneve: World Health Organization; 2007.
- [2] Derrick SC, Repique C, Snoy P, et al. Immunization with a DNA Vaccine Cocktail protects Mice Lacking CD4 cells against an Aerogenic Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity 2003; 72(3):1685-92.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. [WHO report 2006]. Geneva; 2006.
- [4] Fine PEM, Vynnycky E. The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g. BCG) vaccines. Vaccine 1998;16:1923-28.
- [5] Fine, PEM. 2001. "BCG Vaccines and Vaccination." In *Tuberculosis: A Comprehensive International Approach*, ed. L. B. Reichman, and E. S. Hershfield, 503-24. New York: Marcel Dekker.

- [6] Kaufman SHE. New issues in tuberculosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004; 63:1150-56.
- [7] Andersen P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends in Microbiology* 2006; 15(1):7-13.
- [8] Skeiky YAW, Sadoff J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature Reviews, Microbiology* 2006; 4(6):469-76.
- [9] Weltman AC, Rose DN. The safety of bacillus Calmette-Guérin vaccination in HIV infection and AIDS. *AIDS* 1993;7:149-157.
- [10] Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Galic SM. Extraordinarily few organisms of a live recombinant BCG vaccine against tuberculosis induce maximal cell-mediated and protective immunity. *Vaccine* 2006;24:443–51.
- [11] Grode L, Seiler P, Baumann S, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*. 2005; 115(9):2472–79.
- [12] Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, et al. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 1997;15:634-36.
- [13] McShane A, Pathan C, Sander N, et al. Hill Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis* 2005;85:47-52.
- [14] Skeiky YAW, Alderson MR, Ovendale PJ, et al. Differential Immune Responses and Protective Efficacy Induced by Components of a

Tuberculosis Polyprotein Vaccine, Mtb72F, Delivered as Naked DNA or Recombinant Protein. *The Journal of Immunology* 2003;22:7618-28.

- [15] Bennekov T, Dietrich J, Rosenkrands I, et al. Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine-induced protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2006;36(12):3346-55.
- [16] Colaco CALS, Bailey CR, Keeble J, et al. BCG (Bacille Calmette–Guérin) HspCs (heat-shock protein–peptide complexes) induce T-helper 1 responses and protect against live challenge in a murine aerosol challenge model of pulmonary tuberculosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2004;32:626–628.
- [17] Majlessi L, Simsova M, Jarvis Z, et al. An Increase in Antimycobacterial Th1-Cell Responses by prime-Boost Protocols of Immunization Does Not Enhance Protection against Tuberculosis. *Infection and Immunity* 2006; 74(4):2128-37.
- [18] Baumann S. Progress in tuberculosis vaccine development. *Curr Opin Immunol* 2006;18(4):438-448.
- [19] Kitaura H, Ohara N, Naito M, et al. Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*. *APMIS* 2000;108(9):558–64.
- [20] Wilson RA, Maughan WN, Kremer L, et al. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic alpha/beta hydrolases. *Journal of molecular biology* 2004;335(2):519-30.

- [21] Rambukkana A, Das PK, Kolk AH, et al. Identification of a novel 27 kDa protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture fluid by monoclonal antibody specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Scand J Immunol* 1993;37(4):4714-478.
- [22] Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria 22 monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect. Immun* 2004;72(4):2014-21.
- [23] Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y. Identification of Murine H2-Dd- and H2-Ab-Restricted T-Cell Epitopes on a Novel Protective Antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun* 2004;72(7):3829-37.
- [24] Almeida CMC, Vasconcelos JR AC, Kipnis A, et al. Humoral Immune Responses of Tuberculosis Patients in Brazil Indicate Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008;15(3):579-581.
- [25] Luna LG. *Manual of Histology Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1968.
- [26] Fine PEM. BCG: The Challenge Continues. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001;33:243-5.
- [27] Nagai S, Wiker HG, Harboe M, et al. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 1991(1);59:372-82.

- [28] Rinke WTF, Bekelie S, Osland A, et al. The Mycobacterium leprae antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C and related and MPT51 proteins. *Infect Immun* 1993; 61(9):3642-3647.
- [29] Ohara N, Nishiyama T, Ohara-Wada N, et al. Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85 C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb. Pathog* 1997;23(5):303-10.
- [30] Ohara N, Ohara-Wada N, Kitaura H, et al. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity* 1997;65(9):3680-85.
- [31] Lee BY, Horwitz JMA. Identification of Macrophage and Stress-induced Proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Invest* 1995;96:245-9.
- [32] Aoshi T, Nagata T, Suzuki M, et al. Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infection and Immunity* 2008;76(4):1565-71.
- [33] Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. *The Journal of Immunology* 2001;22:3555-58.
- [34] Schnare M, Holt AC, Takeda K, et al. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Brief Communication Current Biology* 2000;10:1139-42.

- [35] Yi AK, Klinman DM, Martin TL, et al. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA: systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 1996;157:5394-5402
- [36] Sweet MJ, Stacey KJ, Kakuda DK, et al. IFN- γ primes macrophage responses to bacterial DNA. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:263-71.
- [37] Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA: Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996;157:2116-22.
- [38] Yi AK, Krieg AM: Rapid induction of mitogen activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol* 1998;161:4493-97.
- [39] Hacker H, Mischak H, Miethke T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998;17:6230-40.
- [40] Klinman, DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2(2):305-15.
- [41] Cowdery JS, Chace JH, Yi A-K, et al. Bacterial DNA induces NK cells to produce interferon-g in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996;156:4570-5.
- [42] Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, et al. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-g production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis *in vitro*. *Eur J Immunol* 1999;29:2344-53.

- [43] Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 70:849-860.
- [44] Miller LH, Saul A, Mahanty S. Revisiting Freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. *TRENDS in Parasitology* 2005; 21(9):412-14.
- [45] Lindblad EB, Elhay MJ, Silva R, et al. Adjuvant Modulation of Immune Responses to Tuberculosis Subunit Vaccines. *Infection and Immunity* 1997; 65:623–629.
- [46] Freidag BL, Melton GB, Collins F, et al. CpG Oligodeoxynucleotides and Interleukin-12 Improve the Efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination in Mice Challenged with *M. tuberculosis*. *Infection and Immunity* 2000;68:2948–53.
- [47] Hsieh MJ, Junqueira-Kipnis AP, Hoeffler A, et al. Incorporation of CpG oligodeoxynucleotide fails to enhance the protective efficacy of a subunit vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2003;22(5-6):656-60.
- [48] Rigano MM, Dreitz S, Kipnis AP, et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. *Vaccine* 2006;24(5):691-5.
- [49] Junqueira-Kipnis AP, Turner J, Goncalvez-Juarrero M, et al. Stable T-cell population expressing an effector cell surface phenotype in the lungs of mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 2004;72(1):570-5.

- [50] Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophilis in the pathogenesis of asthma. *Immunology today* 1992;13(12):501-7.
- [51] Silva JRL, Boéchat NO. ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatologia pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004;30(4):478-484.
- [52] Umemura M, Yahagi A, Hamada S, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection, *J Immunol* 2007;78:3786–96.
- [53] Flynn JL. *Journal Immunology Tuberculosis. Annual Review of Immunology* 2001;19:93-129.
- [54] Medina E, North RJ. Genetically susceptible mice remain proportionally more susceptible to tuberculosis after vaccination. *Immunology* 1999;96:16-21.
- [55] Taylor L, Turner OC, Basaraba RJ, et al. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71(4):2192–98.
- [56] Aguilar D, Infante E, Martin C, et al. Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/Cmice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis (phoP)* SO2 strain. *Clinical & Experimental Immunology* 2007;147:330-339.

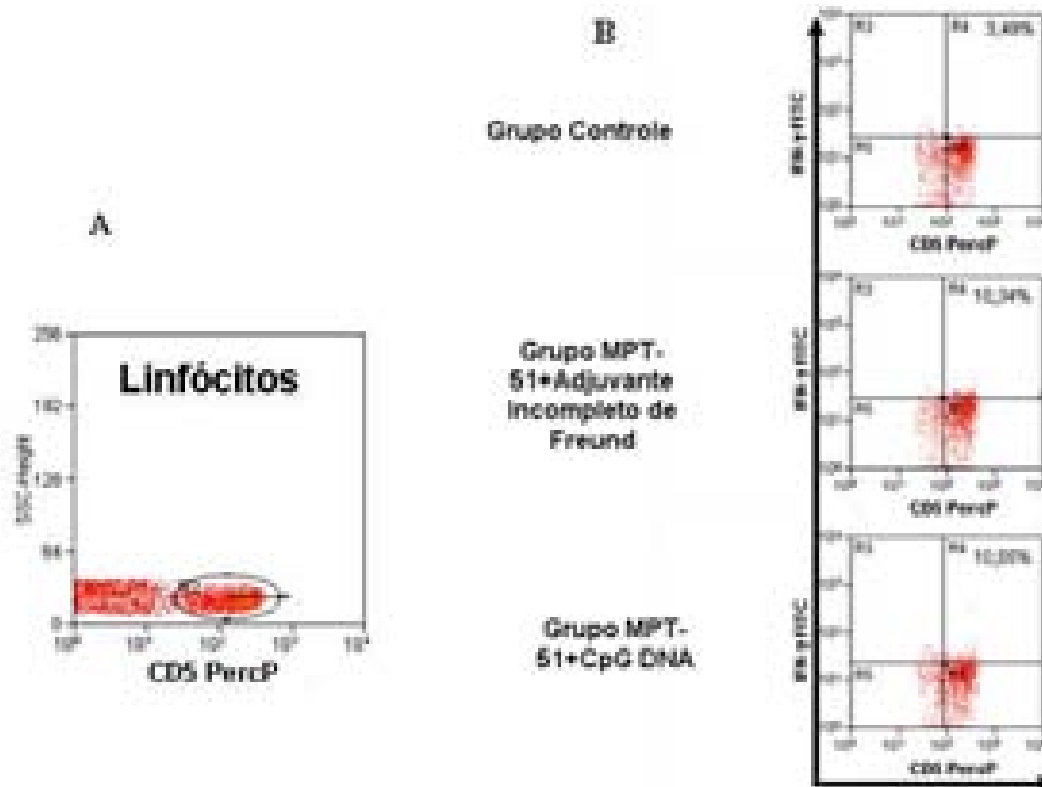


Figura 1. Eventos adquiridos na janela de linfócitos (R2= Seleção dos linfócitos) (A), histograma de linfócitos de camundongos imunizados e estimulados com rMPT-51 (B). Está indicada a porcentagem de linfócitos TCD5⁺IFN- γ ⁺ em cada quadrante.

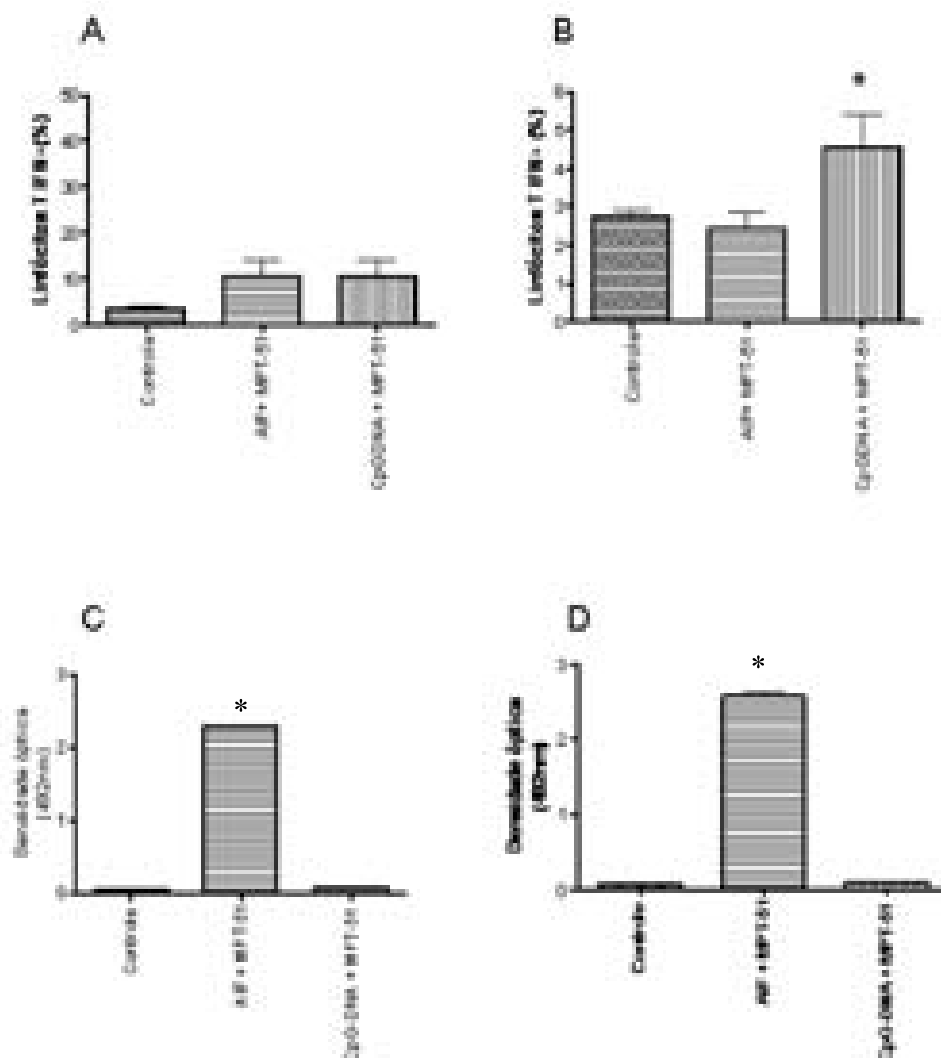


Figura 2. Porcentagem de células TCD5⁺IFN- γ ⁺ no baço de camundongos da linhagem Balb/C imunizados com rMPT-51 e AIF e CpG DNA (A). Porcentagem de células T produtoras de IFN- γ no linfonodo drenante de camundongos da linhagem Balb/C imunizados com rMPT-51 e adjuvante de Freund Incompleto e CpG DNA. * p<0,05 (B). IgG2a específicos para o MPT-51 após os diferentes protocolos de imunização dos camundongos da linhagem Balb/C imunizados com rMPT-51 e AIF e CpG DNA (C). IgG1 específicos para o MPT-51 após os diferentes protocolos de imunização dos camundongos da linhagem Balb/C imunizados com rMPT-51 e AIF e CpG DNA (D).

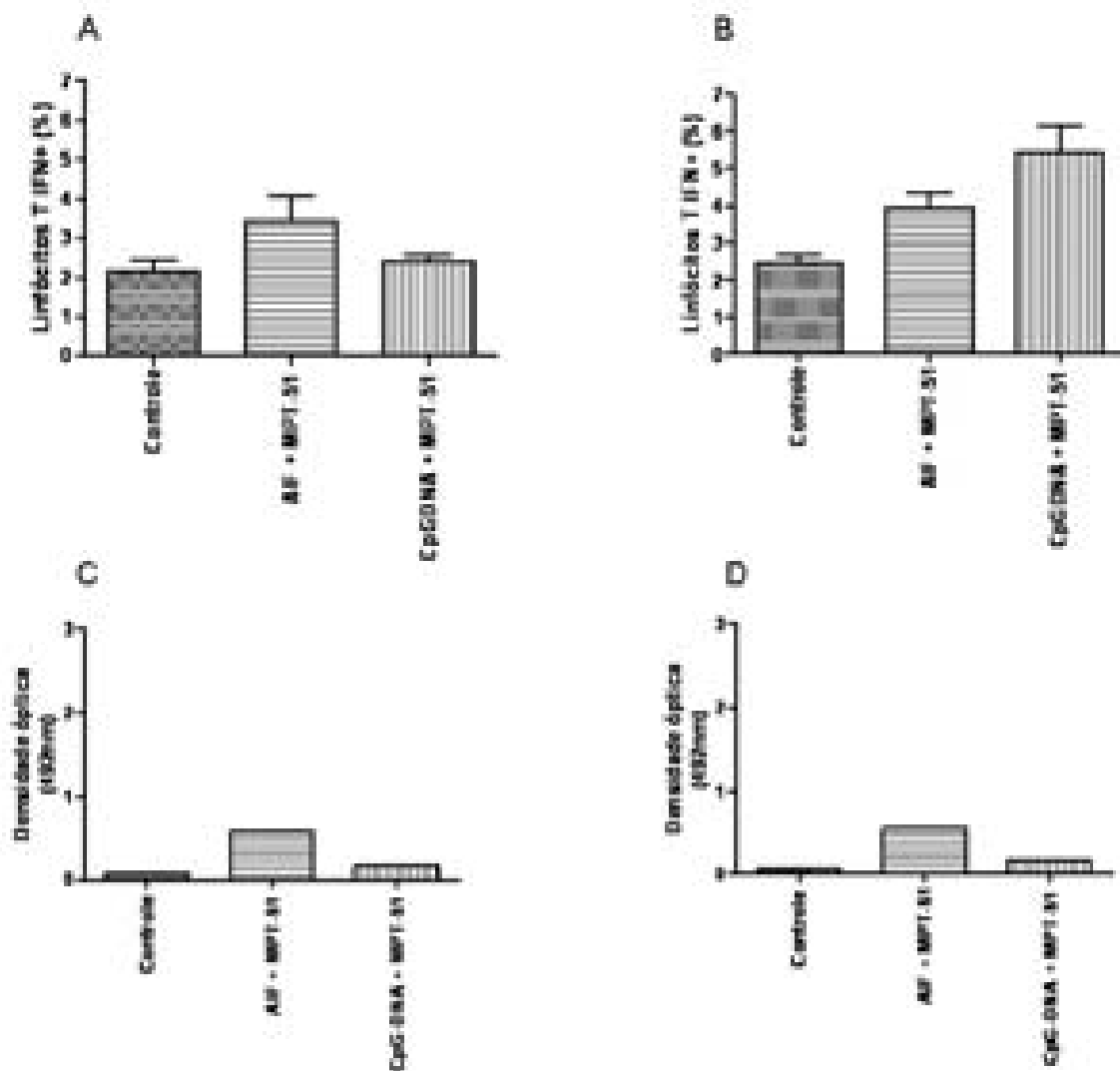


Figura 3. Porcentagem de células T produtoras de IFN- γ no baço de camundongos da linhagem Balb/C, imunizados com antígeno rMPT-51 juntamente com AIF e desafiados com o *M. tuberculosis*. * $p < 0,05$ (A). Porcentagem de células T produtoras de IFN- γ no pulmão de camundongos da linhagem Balb/C, imunizados com antígeno rMPT-51 juntamente com Adjuvante de Freund Incompleto e desafiados com o *M. tuberculosis*. * $p < 0,05$ (B). IgG2a específicos para MPT-51 em camundongos da linhagem Balb/C, após os diferentes protocolos de imunização com rMPT-51 e adjuvante de Freund Incompleto e CpG DNA e posterior desafio com *M. tuberculosis* (H37rv) (C). IgG1 específicos para o MPT-51 em camundongos da linhagem Balb/C, após os diferentes protocolos de imunização com rMPT-51 e AIF e CpG DNA e posterior desafio com *M. tuberculosis* (H37RV) (D).

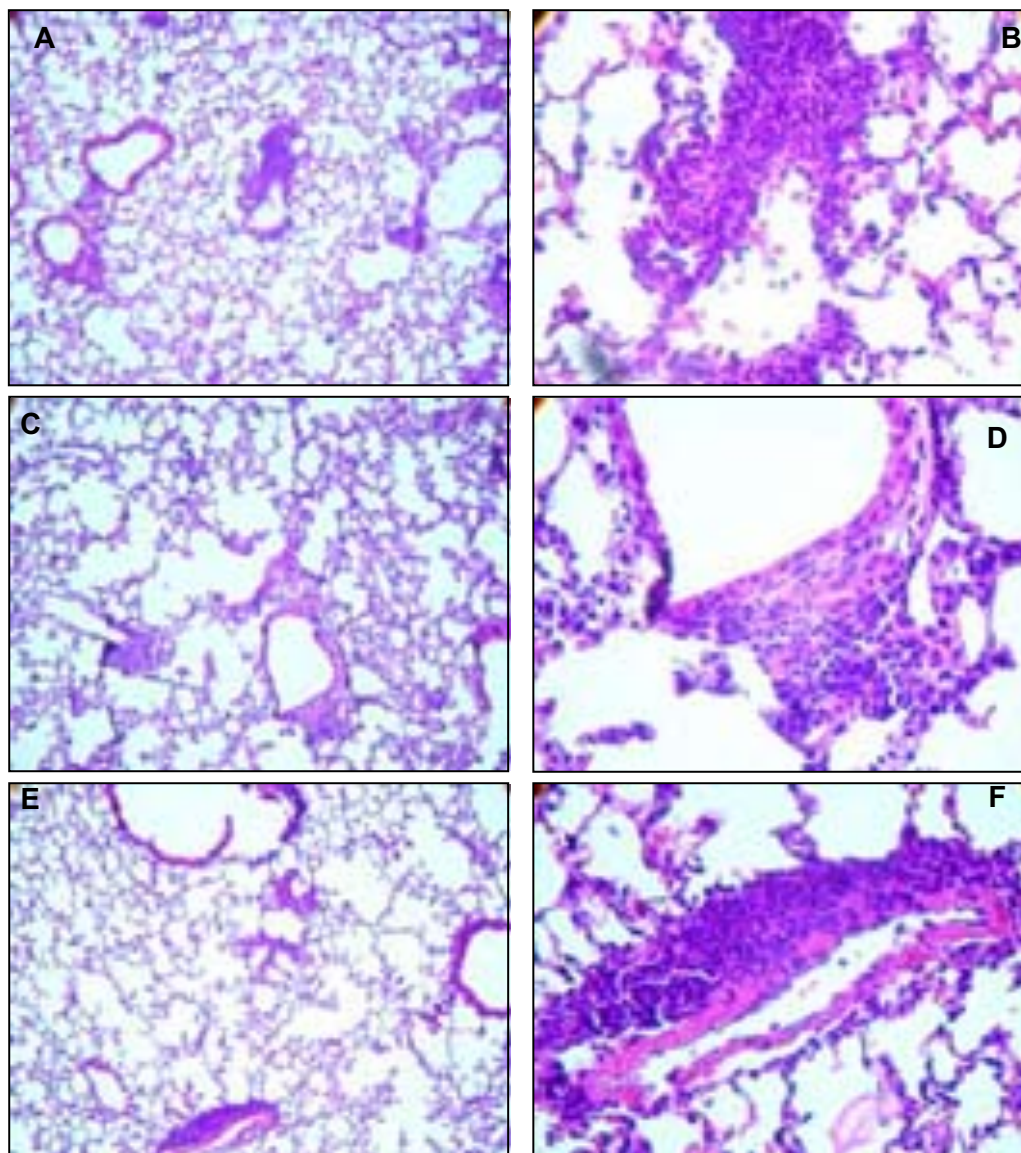


Figura 4. Aspecto histopatológico do pulmão infectado. Grupo controle (A, B), camundongos vacinados com MPT-51 e adjuvante incompleto de Freund (C, D), MPT-51 com CpG (E, F) após os diferentes protocolos de imunização e o desafio com *M. tuberculosis* (H37rv). Observa-se inflamação perivascular, com poucos focos inflamatórios. Coloração com Hematoxilina & Eosina e aumento de 10x (A, C, E) e 40x (B, D, F).

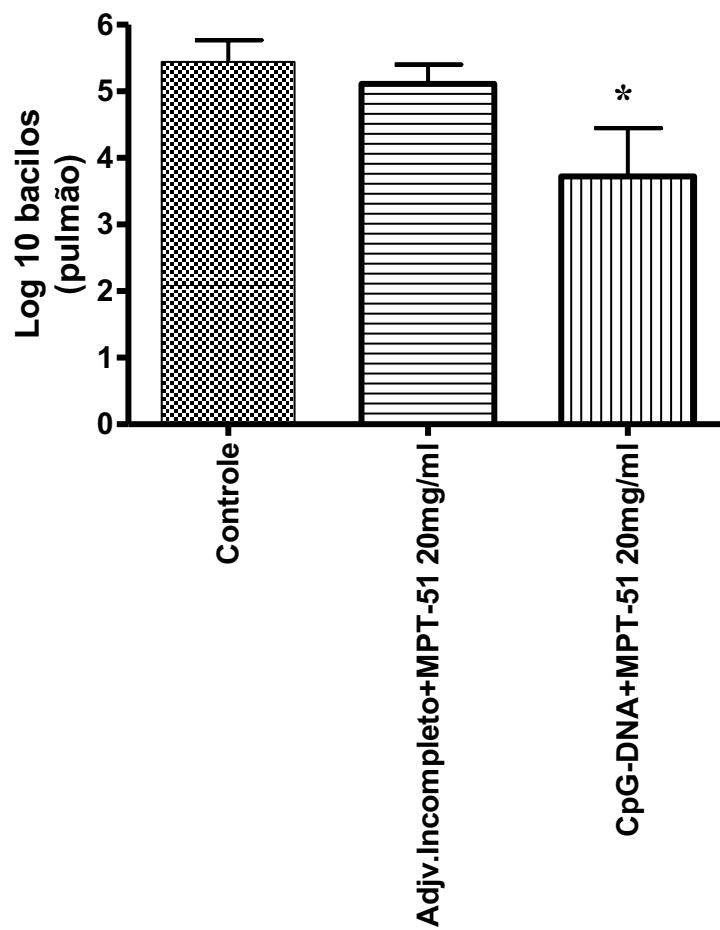


Figura 5. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias de camundongos da linhagem BALB/c, imunizados com antígeno rMPT-51 com 20 μ g/ml e AIF e CpG DNA, desafiados com o bacilo do *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem muitas proteínas antigênicas presentes no *M. bovis* e que são reconhecidas pelos vários subtipos de células do sistema imune adaptativo. Entretanto, de acordo com o ambiente e as pressões exercidas pelo mesmo, as micobacterias alteram a expressão de suas proteínas para melhor adaptação. Portanto, estudos são necessários para identificar a antigenicidade dessas proteínas. Além disso, o estudo acerca dos múltiplos mecanismos de reconhecimentos desses antígenos poderá levar ao desenvolvimento de métodos de diagnósticos e vacinais mais eficazes, o que poderá futuramente culminar com a erradicação da tuberculose bovina e humana.

Decidiu-se pelas proteínas Ag85A e o MPT-51 por serem amplamente avaliados na literatura e pelo extrato total de proteínas do BCG que pode ser facilmente obtido no Brasil. O trabalho apresentado aqui demonstrou que o Ag85 e o BCG são imunogênicos e podem ser auxiliares no diagnóstico da tuberculose bovina.

Todos os testes que visam diagnosticar a tuberculose têm seu valor potencial, entretanto, a progressão crônica da doença não permite uma estimativa acurada das fases iniciais, intermediárias e finais da tuberculose, que influenciam diretamente no diagnóstico. Métodos de diagnósticos rápidos e baratos tendem a facilitar a busca ativa da tuberculose bovina. Por esta razão neste trabalho procurou-se desenvolver uma técnica de ELISA que permitisse uma amostragem das fazendas de uma região e assim selecionar animais positivos para o teste confirmatório regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Apesar de termos identificado os animais positivos, utilizando a técnica de ELISA aqui proposta, alguns animais apesar de serem positivos tanto no ELISA quanto no teste intradérmico não apresentavam sintomatologia compatível com a doença. A diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir na redução das lesões pulmonares, o que possivelmente colabora para a manutenção do estado subclínico de alguns animais. Por isso decidimos aliar a produção de IL-4 nos animais reagentes e não reagentes ao teste intradérmico.

A tuberculose bovina é uma zoonose. O controle e até mesmo a erradicação dessa enfermidade dos rebanhos bovinos, demonstra o avanço sanitário dos países que o fazem. Nesse sentido, o Brasil na condição de país em desenvolvimento deve avançar suas pesquisas para a busca de uma vacina eficaz. Neste estudo, elaboramos vários esquemas de imunizações na tentativa de aprimorar a proteção exercida por uma vacina contra a tuberculose. O antígeno recombinante MPT-51, quando associado ao CpG DNA, foi capaz de estimular a produção de células $TCR5^+IFN-\gamma^+$ e a diminuição da carga bacteriana, além de preservar a integridade funcional do pulmão dos camundongos, quando desafiados.

A partir deste trabalho, estudamos alguns aspectos da resposta imune em animais naturalmente infectados com a tuberculose, para a compreensão da resposta imune inata e adaptativa. Baseado no conhecimento da imunogenicidade de algumas proteínas buscou-se uma alternativa de meio de diagnóstico mais prático e sensível e uma vacina de subunidade protéica. Esse estudo foi importante também, para a compreensão da função da IL-4 e do NO na tuberculose bovina.