

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Caroline de Souza Almeida

**NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE DETERMINADOS PELO ENSAIO CITOMÉTRICO DE
ESFERAS ORDENADAS**

Juiz de Fora

2008

CAROLINE DE SOUZA ALMEIDA

**NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE DETERMINADOS PELO ENSAIO CITOMÉTRICO DE
ESFERAS ORDENADAS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora

2008

Almeida, Caroline de Souza

Níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes com tuberculose determinados pelo ensaio citométrico de esferas ordenadas / Caroline de Souza Almeida ; orientador: Prof. Henrique Couto Teixeira.

-- 2008.

139 f. il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia, Genética e Biotecnologia)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Citocinas. 3. Quimiocinas.

I. Teixeira, Henrique Couto, orientador. II. Título.

CDU 579.61

CAROLINE DE SOUZA ALMEIDA

**NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM PACIENTES COM
TUBERCULOSE DETERMINADOS PELO ENSAIO CITOMÉTRICO DE
ESFERAS ORDENADAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora Aprovada pela Banca Examinadora composta por:

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Juiz de Fora

__ / __ / __

Dedico este trabalho à minha família (Regina, Gilmar e Matheus) e ao meu namorado Paulo pelo apoio incondicional em todos os momentos e por serem o “alicerce” da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Regina e Gilmar por todo apoio para a realização de mais um grande sonho;

Ao meu namorado Paulo pelo amor, companheirismo e pela grande ajuda na elaboração do meu trabalho; agradeço também à sua família (Leninha, Paulo e Bianca) pelo carinho e dedicação por todos esses anos;

Ao meu irmão Matheus por sua ajuda com a informática;

Aos meus avós, aos meus tios e primos pela torcida;

Aos meus grandes amigos Alessandra, Lyvia, Marina, Suelen e Welbert e por estarem sempre presentes e pelo incentivo;

Em especial à Lyvia pela ajuda com o inglês;

Ao meu orientador Professor Dr. Henrique Couto Teixeira pelo suporte, incentivo, orientação científica e por acreditar no meu trabalho;

À Professora Dra. Clarice Abramo pela orientação científica, pela amizade, por me amparar nos momentos difíceis e pelo carinho;

À Professora Dra. Ana Paula Ferreira pelo apoio e conselhos valiosos, e pelo esforço contínuo em criar e melhorar o programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Mestrado em Imunologia/ Genética e Biotecnologia-UFJF;

À todos os professores do curso de mestrado pelo apoio e por contribuírem para minha formação acadêmica;

Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia-UFJF;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia-UFJF: Professora Dra. Maria Aparecida de Souza, Professora Dra. Michele Barsante, Francisco, Alice, Michele Rodrigues, Suelen, Bruno, Luciano Mazzoccoli, Ana Luísa, Luciano Casali, Isabelly, Caio, Ana Maria, Michelle Vicentini, Marina, Márcio, Juliana, Lívia, Alyria, Bianca, Luísa e Natália pela amizade e ajuda na realização deste trabalho;

Em especial aos alunos Ana Luísa, Luciano Casali e Luciano Mazzoccoli que durante suas iniciações científicas contribuíram efetivamente para realização deste trabalho;

Em especial ao Caio César de Souza Alves pela ajuda fundamental na realização da citometria de fluxo, pela grande orientação científica e pela amizade;

Aos funcionários da Policlínica Central de Juiz de Fora pelo auxílio no recrutamento de pacientes e na coleta das amostras sanguíneas;

À todos aqueles que gentilmente doaram suas amostras sanguíneas para realização deste trabalho;

Ao Dr. Tom H. E. Ottenhoff, da Leiden University Medical Center, Holanda, pela colaboração e doação dos antígenos utilizados neste estudo.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Àqueles(as) cujos nomes involuntariamente não foram citados.

RESUMO

Um terço da população mundial está infectada com o *Mycobacterium tuberculosis*. Novos métodos de diagnóstico e a vacinação contra tuberculose (TB) são necessários para o controle da doença. A resposta imunológica contra o *M. tuberculosis* envolve a produção de várias citocinas e quimiocinas, porém suas interações durante a infecção são bastante complexas. O presente trabalho teve como objetivo o estudo da produção de citocinas e quimiocinas durante a tuberculose pulmonar, frente a estímulos de antígenos do *M. tuberculosis*. Através do método citométrico de esferas ordenadas (CBA-Cytometric Bead Array) foi possível avaliar os níveis plasmáticos das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8, RANTES e MCP-1 em pacientes com tuberculose ativa não tratada (TBA), em pacientes sob tratamento (TBST), em pacientes tratados (TBT) e em indivíduos controles sadios (CS). Utilizando esse mesmo método também foi realizada a mensuração das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10 e IL-4 e das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8, RANTES e MCP-1, produzidas em cultura de células mononucleares do sangue periférico após estímulo com os antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa, nos grupos de pacientes com tuberculose ativa não tratada (TBA), de pacientes tratados (TBT), de indivíduos controles sadios (CS) e de indivíduos contatos de pacientes com tuberculose (CT). As quimiocinas plasmáticas MIG, IP-10 e IL-8 estavam elevadas no grupo TBA, em comparação aos demais grupos (CS, TBST e TBT); e ainda os níveis das quimiocinas analisadas no plasma diminuíram após o início do tratamento. Nos ensaios "in vitro" com PBMC humanas, as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 e as quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES foram estimuladas em níveis maiores, pelo ESAT-6/CFP-10, nos grupos TBA e CT em relação aos controles e pacientes tratados, enquanto que o estímulo com antígeno 16kDa não permitiu diferenciar entre os grupos estudados quanto a produção dessas citocinas e quimiocinas. Já as citocinas IL-10 e IL-4 e a quimiocina MCP-1 apresentaram níveis elevados nas culturas de PBMC de indivíduos controles e contatos quando estimuladas com os antígenos do *M. tuberculosis* estudados em relação aos pacientes com tuberculose. O antígeno ESAT-6/CFP-10 diferenciou a tuberculose ativa quanto à produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2, e das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES, as quais podem contribuir para uma resposta protetora na tuberculose. O antígeno 16kDa se mostrou um forte estimulador de IL-10 e MCP-1, moléculas que podem atuar como reguladoras ou inibidoras da resposta imunológica contra a infecção por *M. tuberculosis*, sugerindo o papel importante deste antígeno em favorecer a persistência do bacilo no hospedeiro. Os níveis de quimiocinas plasmáticas podem ser eficazes em diferenciar os pacientes com tuberculose ativa de indivíduos controles e ainda pode ser útil em monitorar o efeito do tratamento quimioterápico anti-tuberculose. O entendimento da dinâmica resposta imunológica contra antígenos do *M. tuberculosis* pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de combate à tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, citocinas, quimiocinas, ESAT-6/CFP-10 e 16kDa.

ABSTRACT

One-third of the world's population is currently infected with *Mycobacterium tuberculosis*. The development of new methods of diagnosis and vaccines against tuberculosis (TB) are necessary for disease control. The immune response against *M. tuberculosis* involves the production of many cytokines and chemokines, but their interaction during the infection is complex. The objective of this work was to study the production of cytokines and chemokines in pulmonary TB under stimulation of *M. tuberculosis* antigens. The method of Cytometric Bead Array (CBA) was used to evaluate plasma levels of chemokines MIG, IP-10, IL-8, MCP-1 and RANTES in untreated patients with active TB (ATB), in patients during treatment (DTB) and in treated patients (TTB) and healthy controls individuals (HC). We also evaluated, by CBA, the levels of cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10 and IL-4, and chemokines MIG, IP-10, IL-8, MCP-1 and RANTES, in culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after stimulation with the antigens ESAT-6/CFP-10 and 16kDa, in groups of untreated patients with active TB (ATB), in treated patients (TTB), healthy controls individuals (HC) and in contact individuals of patients with TB (CT). The production of plasma chemokines, the levels of MIG, IP-10 and IL-8 were higher in the group ATB, compared to the other (HC, DTB and TTB), and the levels of chemokines analyzed in plasma decreased after the beginning of the treatment. In assays with human PBMC, the cytokine IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2 and chemokines MIG, IP-10, IL-8 and RANTES were stimulated at higher levels, by the fusion protein ESAT-6 / CFP-10, in groups ATB and CT in relation to the controls and treated patients. The stimulation with antigen 16kDa did not allow for differentiation of these cytokines and chemokines between the groups. IL-10, IL-4 and MCP-1 showed high levels in the cultures of PBMC from healthy control individuals and contacts when stimulated with the studied *M. tuberculosis* antigens compared to patients with TB. The antigen ESAT-6/CFP-10 differentiated active TB with regard to the production of cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-2 and chemokines MIG, IP-10, IL-8 and RANTES, which can contribute to a protective response in TB. The antigen 16kDa was a strong stimulator of IL-4, IL-10 and MCP-1 molecules that can regulate or inhibit the immune response against *M. tuberculosis* infection, demonstrating the important role of this antigen in promoting the persistence of the bacillus in the host. The plasma levels of chemokines can be effective in differentiating patients with active TB from the healthy control individuals, and can also be useful in monitoring the effect of anti-TB chemotherapy. The comprehension of the dynamics of the immune response against *M. tuberculosis* antigens can aid the development of new strategies to combat tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, cytokines, chemokines, ESAT-6/CFP-10 and 16kDa.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Estimativa mundial de novos casos de TB em 2004 (WHO, 2004).....	17
Figura 2 - Concentração das quimiocinas MIG (A), IP-10 (B) e IL-8 (C) no plasma de indivíduos controles sadios e pacientes com tuberculose.....	54
Figura 3 - Concentração das quimiocinas MCP-1 (A) e RANTES (B) no plasma de indivíduos controles sadios e pacientes com tuberculose.....	56
Figura 4 - Níveis de quimiocinas no plasma dos mesmos pacientes, dosados antes e após o tratamento.....	57
Figura 5 - Produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos <i>M. tuberculosis</i> dosadas nos indivíduos controles sadios, nos indivíduos contatos com pacientes com TB, nos pacientes não tratados com TB ativa e nos pacientes tratados.....	60
Figura 6 - Produção das citocinas IL-10 e IL-4 por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos <i>M. tuberculosis</i> dosadas nos indivíduos controles sadios, nos indivíduos contatos com pacientes com TB, nos pacientes não tratados com TB ativa e nos pacientes tratados.....	62
Figura 7 - Produção das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos <i>M. tuberculosis</i> dosadas nos indivíduos controles sadios, nos indivíduos contatos com pacientes com TB, nos pacientes não tratados com TB ativa e nos pacientes tratados.....	64
Figura 8 - Produção de MCP-1 por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos <i>M. tuberculosis</i> dosadas nos indivíduos controles sadios, nos indivíduos contatos com pacientes com TB, nos pacientes não tratados com TB ativa e nos pacientes tratados.....	65
Tabela 1 - Caracterização, tempo de tratamento e dados clínicos dos pacientes com TB pulmonar, estudados quanto à produção de quimiocinas no plasma.....	45

Tabela 2 - Caracterização, tempo de tratamento e dados clínicos dos pacientes com TB pulmonar, estudados quanto à produção de citocinas e quimiocinas em cultura.....	46
Tabela 3 - Classificação da TB pulmonar de acordo com a National Tuberculosis Association (1961).....	47
Tabela 4 - Dados dos indivíduos controles, estudados quanto à produção de quimiocinas no plasma.....	47
Tabela 5 - Dados dos indivíduos controles e contatos, estudados quanto à produção de citocinas e quimiocinas em cultura.....	48
Tabela 6 - Concentração média de quimiocinas no plasma de indivíduos controles sadios, de pacientes com TB ativa, de pacientes sob tratamento e de tratados.....	55
Tabela 7 - Concentração das quimiocinas MCP-1 e RANTES no plasma de indivíduos controles sadios, de pacientes com TB ativa, de pacientes sob tratamento e de tratados.....	56
Tabela 8 - Concentrações médias de quimiocinas durante cada mês de tratamento no grupo de pacientes com TB sob tratamento.....	58
Tabela 9 - Produção média de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 por PBMC em cultura sob estímulo de antígenos do <i>M. tuberculosis</i> , nos grupos de indivíduos controles sadios, de indivíduos contatos com pacientes TB, de pacientes com TB ativa e de pacientes tratados.....	61
Tabela 10 - Produção média de IL-10 e IL-4 por PBMC em cultura sob estímulo de antígenos do <i>M. tuberculosis</i> , nos grupos de indivíduos controles sadios, de indivíduos contatos com pacientes TB, de pacientes com TB ativa e de pacientes tratados.....	62
Tabela 11 - Produção média de quimiocinas por PBMC em cultura sob estímulo de antígenos do <i>M. tuberculosis</i> , nos grupos de indivíduos controles sadios, de indivíduos contatos com pacientes TB, de pacientes com TB ativa e de pacientes tratados.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS – “Acquired Immunodeficiency Syndrome” / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- APCs – “Antigen-Presenting Cells” / Células Apresentadoras de Antígenos
- BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente
- BAL – “Bronchoalveolar lavage” / Lavado Broncoalveolar
- BCG – Bacilo Calmette-Guérin
- CBA – “Cytometric Bead Array” / Ensaio Citométrico de Esferas Ordenadas
- CCR2 – receptor de MCP-1, -2, -3, -4, -5
- CD – “Clusters of differentiation” / moléculas expressas na superfície de leucócitos
- CS – indivíduos controles sadios
- CT– indivíduos que tiveram contato com pacientes com tuberculose
- CFP-10 – “culture filtrate antigen-10”
- CXCR3 – receptor das quimiocinas MIG, IP-10 e I-TAC
- DMSO – dimetil sulfóxido
- DNA – “Deoxyribonucleic Acid” / Ácido desoxirribonucléico
- DosR – “Dormancy Regulon”
- DTH – “Delayed-type Hypersensitivity” ou hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)
- ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” / Ensaio de Absorção Imunoenzimático
- ELISPOT – “Enzyme Linked Immunospot Assay”
- ESAT-6 – “early secreted antigenic target-6”
- FDA – Food and Drug Administration
- HIV – “Human Immunodeficiency Virus” / Vírus da Imunodeficiência Humana
- HSP – “Heat Shock Proteins” / Proteína de Choque Térmico
- GAG – “Sulfated Sugars of Glycosaminoglycan” / Açúcares Sulfatados de Glicosaminoglicanas
- IFN- γ – interferon-gama
- Ig – Imunoglobulina
- IL-1 – Interleucina-1
- IL-2 – Interleucina-2

IL-4 – Interleucina-4
IL-5 – Interleucina-5
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8 – CXCL8
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-13 – Interleucina-13
IL-18 – Interleucina-18
IP-10 – “Interferon-gamma Inducible Protein-10” - CXCL10 / Proteína Induzida por Interferon-gama-10
kb – “kilobases”
kDa – “kilo-Dalton”
MCP-1 – “Monocyte Chemotactic Protein-1” - CCL2 / proteína quimiotática de monócito
MHC – “Major Histocompatibility Complex” / Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIG – “Monokine Induced by Interferon-gamma” - CXCL9 / Monocina Induzida por Interferon-gama”
MIP-1 α – “Macrophage Inflammatory Protein-1alfa” - CCL3 / Proteína Inflamatória de Macrófago-1alfa
NK – “Natural Killers Cells” / células matadoras naturais
NO – “Nitric Oxide” / óxido nítrico
NOS2 – “Nitric Oxide Synthase Enzyme 2” / Enzima Óxido Nítrico Sintase 2
ORF – “Open Reading Frame”
OMS – “World Health Organization” / Organização Mundial da Saúde
PBMC – “Peripheral Blood Mononuclear Cells” / Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS – “Phosphate Buffered Saline” / Salina Tamponada com Fosfato
PCR – “Polymerase Chain Reaction” / Reação em Cadeia da Polimerase
PPD – “Purified Protein Derivative” by *Mycobacterium tuberculosis* / Derivado Protéico Purificado do *M. tuberculosis*
RANTES – “Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted” - CCL5
RD – região de diferença
RNI – Intermediários Reativos do Nitrogênio

ROI – Intermediários Reativos do Oxigênio

RNAm – “Messenger Ribonucleic Acid”/ácido ribonucléico mensageiro

TB – Tuberculose

TBA – pacientes com tuberculose ativa (não tratada)

TBST – pacientes que estão em tratamento (sob tratamento)

TBT – pacientes que já finalizaram o tratamento (tratados)

TCR – “T-cell receptor” / Receptor da Célula T

TGF- β – “Transforming Growth Factor-Beta” / Fator de Transformação do Crescimento-beta

Th – células T helper

TLR – “Toll-Like Receptors” / Receptores do Tipo Toll

TNF- α – “Fator de Necrose Tumoral-alfa” / Fator de Necrose Tumoral-alfa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE.....	16
1.2 CONTROLE DA DOENÇA.....	18
1.3 ANTÍGENOS DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA TUBERCULOSE.....	27
2 OBJETIVOS.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	44
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS.....	48
3.3 EXTRAÇÃO DE QUIMIOCIAS NO PLASMA HUMANO.....	49
3.4 CULTURA DE PBMC ESTIMULADAS COM ANTÍGENOS DO <i>M. tuberculosis</i>	50
3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE CBA.....	50
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4 RESULTADOS.....	53
4.1 ESTUDO DOS NÍVEIS DE QUIMIOCIAS NO PLASMA HUMANO.....	53
4.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS POR PBMC APÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS DO <i>M. tuberculosis</i>	59
5 DISCUSSÃO.....	66
5.1 QUIMIOCIAS PLASMÁTICAS NA TUBERCULOSE.....	66
5.2 CITOCINAS E QUIMIOCIAS PRODUZIDAS APÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS DO <i>M. tuberculosis</i>	71
6 CONCLUSÕES.....	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8 ANEXOS.....	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e é transmitida através da inalação de bacilos, presentes em gotículas no ar eliminadas por indivíduos portadores de TB ativa. Esse bacilo é um patógeno extraordinariamente efetivo em humanos (TUFARIELLO, CHAN e FLYNN, 2003) e apresenta crescimento lento no interior de macrófagos. É um organismo aeróbio estrito com capacidade de persistir nos tecidos.

O *M. tuberculosis* foi primeiramente identificado como um agente patogênico em 1882 por Robert Koch. A humanidade é afetada pela TB há milhares de anos. É presumido que o gênero *Mycobacterium* exista há mais de 150 milhões de anos (HAYMAN, 1984). Segundo Daniel (2006) o *M. tuberculosis* pode ter matado mais pessoas que qualquer outro patógeno microbiano. Apesar de décadas de pesquisas sobre a TB e o uso amplo da vacina BCG (Bacilo Calmette Guérin), a doença ainda permanece como um grave problema de saúde pública, sendo declarada como emergência global pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1993 (WHO, 2002). A TB pode ser prevenida e curada na maioria dos casos, porém vários fatores demográficos e socioeconômicos podem dificultar o tratamento e a prevenção da doença (TUFARIELLO, CHAN e FLYNN, 2003).

A cada segundo uma pessoa no mundo é infectada com o *M. tuberculosis*, sendo que um terço da população mundial é portadora deste bacilo. A TB causa cerca de dois milhões de mortes por ano (WHO, 2007). Setenta e cinco por cento das pessoas doentes com TB estão em idade economicamente produtiva (entre 15-54 anos). Noventa e cinco por cento de todos os casos e 99% das mortes ocorrem nos países em desenvolvimento, com as maiores taxas provenientes da África Subsaariana e do Sudeste Asiático (DYE, 2006). De acordo com os dados da OMS, presumiu-se que em 2004 surgiriam 8,9 milhões de novos casos da doença (140/100.000 habitantes) e 1,7 milhões de pessoas morreriam por causa da TB (27/100.000) incluindo aqueles co-infectados com o vírus HIV (248.000) (Fig. 1) (WHO, 2004). Segundo a OMS, no Brasil estima-se que 50 milhões de pessoas

estão infectadas e 6.000 mortes/ano estão relacionadas à TB. Na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais foram relatados 42/100.000 habitantes novos casos de tuberculose pulmonar em 2007 (SINAN, 2007).

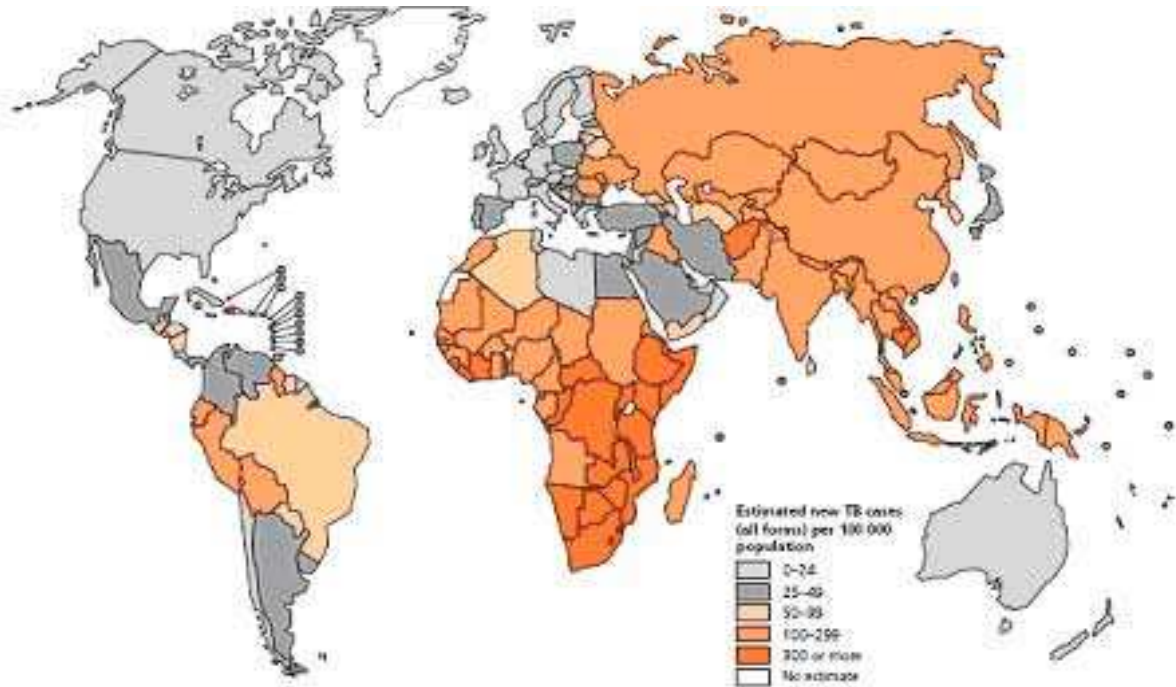


Figura 1 - Estimativa mundial de novos casos de TB em 2004 (WHO, 2004).

Embora seja transmitido por via respiratória, o *M. tuberculosis* pode causar doença em vários órgãos, mas a TB pulmonar é a forma mais comum (FLYNN e CHAN, 2001a). Uma pequena porcentagem (de 5 a 10%) de pessoas infectadas com *M. tuberculosis* desenvolve a doença ativa. Logo, a maioria dos portadores do bacilo é assintomática, representando uma grande parcela de indivíduos reservatórios desta bactéria, a qual permanece em estado de latência. Nesse período pode ser estabelecido um equilíbrio entre o hospedeiro e os bacilos, após a formação de uma lesão granulomatosa que aparentemente controla a infecção (FLYNN e CHAN, 2001b). Os bacilos conseguem escapar da eliminação, sobrevivendo em condições adversas e diminuindo seu metabolismo. Esses mecanismos de escape da micobactéria durante o período latente ainda permanecem obscuros. Ocasionalmente a resposta imunológica falha e ocorre reativação da doença. Isso acontece devido a diversos fatores como co-infecção com o vírus HIV, desnutrição, idade avançada, uso de esteróides e outras medicações imunossupressoras (FLYNN e CHAN, 2001a).

Os indivíduos com TB ativa podem apresentar os seguintes sintomas: tosse persistente por mais de duas semanas, falta de apetite, emagrecimento, indisposição, febre e sudorese noturna. Segundo North e Jung (2004) as pessoas susceptíveis com doença ativa constroem uma imunidade específica contra o patógeno, representada por uma imunidade celular aos antígenos do *M. tuberculosis* na forma de reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), expressando principalmente a imunidade do tipo Th1. As interações entre os bacilos e as células T CD4⁺ e CD8⁺, macrófagos, células dendríticas entre outras, determina a resolução ou a persistência da infecção no hospedeiro.

Em 1985 a TB voltou a crescer nos países industrializados (PALOMINO, LEÃO e RITACCO, 2007). Fatores responsáveis por essa ressurgência podem ser citados como o aumento de presidiários, de moradores de rua, do uso de drogas injetáveis e de imigrantes provenientes de países onde a doença é endêmica. Porém, o declínio do controle da TB com o surgimento de cepas resistentes de *M. tuberculosis*, e a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foram as maiores causas da remergência dessa doença.

A TB e o vírus HIV são uma combinação letal, sendo que a AIDS é um potente fator de risco para TB. O vírus HIV não somente aumenta a chance de reativação da infecção latente por *M. tuberculosis*, mas também aumenta o risco de uma rápida progressão da TB. A doença é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em adultos HIV-positivos (CORBERTT, 2003; AARON et al., 2004; WHO 2006).

1.2 CONTROLE DA DOENÇA

1.2.1 VACINAÇÃO

No século XIX, na França, os pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram uma vacina através de 230 passagens sucessivas pelo cultivo *in vitro* de uma cepa patogênica de *M. bovis*. Essas experiências resultaram em uma cepa atenuada conhecida como Bacilo Calmette Guérin (BCG), a qual era avirulenta para bovinos, eqüinos, coelhos e cobaias (PALOMINO, LEÃO e RITACCO, 2007). A

vacina BCG foi administrada em humanos pela primeira vez em 1921 e até hoje é usada mundialmente na prevenção da TB. Contudo, a proteção desta vacina oscila entre 0 a 80% (MUSTAFA, 2002). A BCG pode ser eficiente na redução da incidência de TB na infância, porém é relativamente ineficaz em proteger adultos contra a doença (FLYNN, 2004). Sua variável eficácia tem sido atribuída a vários fatores, incluindo a via de vacinação, a dose, a cepa de BCG utilizada, as exposições anteriores a micobactérias do ambiente (GIRI et al., 2006) e a grandes deleções em segmentos do genoma do BCG em comparação ao do *M. tuberculosis* (MAHAIRAS et al., 1996). Logo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas vacinas específicas contra a TB, a fim de se conseguir uma proteção imunológica duradoura contra a doença.

Muitos estudos para delinear uma nova vacina contra a TB envolvem a construção de vacinas BCG recombinantes ou aprimoramento da resposta imunológica ao BCG através de uma segunda dose da vacina contendo antígenos específicos do *M. tuberculosis* (PALOMINO, LEÃO e RITACCO, 2007), mas a vacinação efetiva contra TB ainda é um desafio. O uso de subunidades capazes de auxiliar a resposta imunológica contra antígenos micobacterianos imunodominantes tem sido bastante pesquisado, como exemplo pode ser citada a vacina construída a partir do vírus Ankara expressando o antígeno 85A presente no *M. tuberculosis*. Esta foi capaz de induzir altos níveis de células T específicas para o antígeno e secretoras de interferon-gama (IFN- γ) em humanos anteriormente vacinados com BCG, em comparação àqueles que haviam recebido somente a vacina BCG (MCSHANE et al., 2004). Também se destacam os estudos com cepas de BCG mutantes, como realizado por Grode et al. (2005) em camundongos BALB/c. A vacina delineada consistia de uma cepa de BCG mutante que secretava listeriolinisa, capaz de melhorar a apresentação antigênica e induzir uma efetiva resposta de células T CD8, quando comparada à vacina BCG comumente usada.

Evidências sugerem que a sensibilização com micobactérias ambientais podem ter um efeito antagonista na vacinação com o BCG (FLAHERTY et al., 2006). A exposição prévia a micobactérias ambientais pode primar o sistema imune do hospedeiro contra antígenos micobacterianos compartilhados com o BCG, ocasionando uma resposta imunológica à vacina BCG com eliminação dos bacilos, diminuindo a proteção contra TB. Por isso torna-se importante incluir antígenos

específicos do *M. tuberculosis*, ausentes nas micobactérias ambientais e no BCG, em novas vacinas.

A indução de células T e B específicas, a migração de células apropriadas para o sítio da infecção, o desempenho de suas funções efetoras e a redução do prejuízo causado pela imuno-estimulação crônica devem ser considerados para se desenvolver uma vacina eficaz contra microrganismos complexos, como o *M. tuberculosis* (FLYNN, 2004). O conhecimento sobre antígenos específicos reconhecidos pelo sistema imune e sobre os mecanismos de escape da resposta imunológica, desenvolvidos pelo patógeno, pode favorecer o desenvolvimento de novas estratégias de combate à TB.

1.2.2 DIAGNÓSTICO

Outras formas de conter a disseminação da TB na população envolvem métodos de diagnóstico rápidos e eficientes seguidos de tratamento apropriado. Os métodos de diagnóstico mais comumente usados para TB se caracterizam pela baciloscopia, pela cultura, pelo exame da radiografia dos pulmões, teste cutâneo com o derivado protéico purificado do *M. tuberculosis* (“purified protein derivative” - PPD).

Vários estudos têm sido realizados visando à criação de novos métodos de diagnóstico para TB (PAI, RILEY e COLFORD, 2004; YEW e LEUNG, 2006; LAGRANGE et al., 2007). Embora novos métodos de diagnóstico tenham sido desenvolvidos, os métodos convencionais ainda são bastante usados. Entre eles está a baciloscopia que envolve a detecção de *M. tuberculosis* no escarro de pacientes com suspeita de TB, através da coloração de bacilos pelo método de Ziehl-Neelsen, o qual permite visualizar por microscopia óptica o BAAR (Bacilo Álcool Ácido Resistente), assim como os bacilos do gênero *Mycobacterium*. A técnica é de baixo custo e se baseia na coloração a quente com fucsina fenicada, seguida de descoloramento com álcool-ácido, fazendo com que somente as micobactérias tenham a coloração vermelha, por serem ácido-resistentes. A baciloscopia pode ser negativada em 30% a 50% dos casos de pessoas infectadas com *M. tuberculosis*, em parte devido à necessidade da presença de pelo menos 5000 bacilos/ml de escarro (FILHO et al., 2004).

O escarro destes pacientes também pode ser submetido à cultura microbiológica principalmente em casos pulmonares suspeitos e negativos à baciloscopia. Este método mostra-se vantajoso por permitir a detecção e o isolamento de micobactérias, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microorganismo aos quimioterápicos para tuberculose. Os principais meios de cultura são o de Löwenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo) e o de Middlebrook (sólido ou líquido, à base de ágar). Porém, o procedimento de cultura do *M. tuberculosis* é demorado, pois o bacilo tem um crescimento lento, e o teste nem sempre apresenta 100% de positividade (FRIEDEN et al., 2003).

Os raios-X posterior e anterior do tórax são tradicionalmente feitos para verificar infiltrações ou consolidações e/ou cavidades, indicado para pacientes sintomáticos e negativos à baciloscopia, e para familiares de pacientes bacilíferos. O método consiste na presença de opacidade radiológica característica, tendo utilidade no diagnóstico da TB pulmonar primária (opacidade mais homogênea e aumento no volume dos linfonodos regionais) e TB pulmonar secundária (opacidade heterogênea, presença de cavidades e nódulos) (FILHO et al., 2004). Nódulos e cicatrizes fibróticas podem conter bacilos da TB em multiplicação lenta, com potencial de progressão para uma futura TB ativa. De modo oposto, lesões granulares calcificadas (granulomas calcificados) apresentam baixíssimo risco de progredirem para uma TB ativa. Entretanto, a análise radiológica não é um exame específico para detectar pacientes com TB, visto que lesões pulmonares semelhantes às causadas pelo *M. tuberculosis* podem ocorrer em outras doenças (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007).

O teste cutâneo com o derivado protéico purificado do *M. tuberculosis* ("purified protein derivative" - PPD) é o teste de diagnóstico imunológico mais usado, porém pode apresentar resultados falso-positivos. O teste consiste em uma injeção intradérmica do purificado protéico na parte anterior do antebraço, e em leitura após 24 a 72 horas de uma reação de hipersensibilidade tardia no local, que gera eritema e endurecimento, o qual pode ser mensurado em milímetros de diâmetro. O tamanho da reação pode indicar positividade ou não ao teste tuberculínico. O teste do PPD possui alta sensibilidade, mas mostra baixa especificidade, pois não discrimina entre indivíduos com a doença ativa de indivíduos vacinados com o BCG, ou de pessoas expostas a micobactérias do ambiente (MUSTAFA, 2002). Tal fato

ocorre devido à presença de antígenos no PPD que são compartilhados com micobactérias do ambiente e com o BCG (AREND et al., 2001).

Os testes imunológicos relacionados à produção de interferon-gama (IFN- γ) por células T, em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis*, vêm sendo desenvolvidos na tentativa de substituir o teste cutâneo com o PPD. Uma alta produção de IFN- γ em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis* indica sensibilização prévia, mas não necessariamente implica em doença ativa. Dois testes baseados na produção de IFN- γ por linfócitos T em cultura utilizando antígenos do *M. tuberculosis*, estão disponíveis comercialmente. O primeiro deles foi aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) em 2001, conhecido como QuantiFERON-TB® (Cellestis Limited, Carnegie, Austrália), baseia-se na detecção de IFN- γ produzido por amostras de sangue periférico, cultivadas em placas previamente preparadas, e o sobrenadante é analisado através do método de ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”). O segundo teste é o QuantiFERON-TB-Gold®, aprovado em 2004 pela FDA, se diferencia do teste anterior por usar antígenos específicos do *M. tuberculosis* no lugar do PPD (PAI, RELEY e COLFORD, 2004). Outro teste também desenvolvido a partir da detecção de IFN- γ é o ELISPOT (“Enzyme Linked Immunospot Assay”) onde o número de células produtoras de IFN- γ específicas para um determinado antígeno pode ser quantificado, o T SOPT.TB® (Oxford Immunotec, Oxon, UK) baseado neste mesmo método espera aprovação pela FDA (PAI, RELEY e COLFORD, 2004).

A pesquisa de anticorpos específicos contra micobactérias no soro é bastante atrativa devido à fácil realização do método, e pode ser aplicada no diagnóstico da fase inicial da TB. Um ponto importante é que em pacientes acometidos com AIDS, nos quais o número de células T está diminuído ou mesmo nulo, a determinação da resposta humoral apresenta-se como um instrumento valioso para auxiliar o diagnóstico precoce e o controle epidêmico da infecção pelo *M. tuberculosis* (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). No entanto, os testes sorológicos possuem uma baixa sensibilidade e especificidade. Isto se deve a grande heterogeneidade da resposta humoral em pacientes com TB e a reatividade cruzada com outros antígenos, como aqueles existentes em micobactérias do ambiente, comprometendo sua utilização (LYASHCHENKO et al., 1998).

Também são desenvolvidos como métodos de diagnóstico para TB, os testes de amplificação *in vitro* do DNA da micobactéria através de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), são testes bastante específicos que podem fornecer uma resposta diagnóstica rápida, mas exigem laboratório e pessoal técnico especializado (SPERHACKE et al., 2004).

A ausência de um método que possa diagnosticar a doença em seus estágios iniciais e discriminar precisamente indivíduos que apresentam a doença em estado latente ressalta a importância da realização de estudos baseados no uso de novos antígenos específicos do *M. tuberculosis* e nos ensaios imunológicos que possam suprir essa necessidade.

1.2.3 TRATAMENTO

O tratamento corretamente realizado é fundamental para o controle da TB. Porém, nos últimos 40 anos nenhum novo agente quimioterápico contra TB foi introduzido como tratamento (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). O tratamento anti-TB deve ter como objetivos: matar os bacilos extracelulares vivos presentes nas cavidades pulmonares, os quais são metabolicamente ativos e se dividem continuamente, o que pode ocasionar a negativação do exame de escarro e prevenir a transmissão da doença; realizar completa eliminação daqueles bacilos que se replicam pouco dentro das lesões pulmonares e daqueles semi-latentes que residem dentro do tecido pulmonar ou de outras células do hospedeiro, caso contrário esses bacilos podem persistir nos tecidos e serem responsáveis pela ressurgência da TB (ONYEBUJOH et al., 2005). Por essas razões, a partir da década de 50, o tratamento contra TB passou a ser realizado através de uma terapia combinada de antibióticos, sendo mais eficiente que a monoterapia anteriormente adotada (PALOMINO, LEÃO e RITACCO, 2007).

A izoniazida é uma droga com alta atividade contra os bacilos de rápida divisão celular, enquanto que a rifampicina e a pirazinamida eliminam as bactérias que não estão se dividindo. Atualmente o regime de tratamento recomendado (Centers for Disease Control and Prevention, 2003) para completa eliminação de bacilos ativos e latentes envolve duas fases:

- Fase inicial: são usadas três ou mais drogas, usualmente isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina, por 2 meses e permite uma rápida eliminação de bactérias que estão se dividindo ativamente, resultando na negatificação do exame de escarro;
- Fase tardia: são usadas poucas drogas, como isoniazida e rifampicina, por 4 a 7 meses, tendo como objetivo eliminar os bacilos latentes evitando a reativação da doença;

Em pacientes com AIDS é recomendado um tratamento mais prolongado (por 8 a 9 meses), pois a eficácia da terapia padrão nesses pacientes é incerta. Também pode ocorrer terapia de longa duração (de 12 a 18 meses) em casos de resistência às drogas (BARNES et al., 1991).

1.3 ANTÍGENOS DO *M tuberculosis*

1.3.1. ESAT-6 e CFP-10

Estudos comparativos baseados em ensaios de microarray, têm permitido identificar 16 regiões genômicas presentes no *M. tuberculosis* e ausentes na cepa vacinal de *M. bovis* - BCG, e 5 regiões genômicas presentes no *M. bovis* e ausentes no BCG (MEHER et al., 2006). Estas regiões foram anteriormente designadas como RD (regiões de diferença), onde está localizada uma região do DNA micobacteriano de 9.5kb, chamada RD1, também conservada em todas as cepas clínicas e virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, e ausente na cepa *M. bovis* -BCG e na maioria das micobactérias ambientais (exceto *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens* e *M. marinum*) (MAHARIAS et al., 1996; GOLETTI et al., 2006). A RD1 contém pelo menos nove ORFs (Open Reading Frame), duas das quais codificam pequenas proteínas imunogênicas como Rv3875 ou ESAT-6 (early secreted antigenic target-6) e Rv3874 ou CFP-10 (culture filtrate antigen-10) (LIGHTBODY et al., 2004).

Os genes *esxA* e *esxB*, os quais codificam as proteínas ESAT-6 e CFP-10 respectivamente, são transcritos coordenadamente (BERTHET et al., 1998). Estudos de Guinn et al. (2004) indicaram que a secreção de ambos ESAT-6 e CFP-10 é

regulada pela via ESX-1 (ESAT-6 system-1), um aparato protéico também codificado pelos genes *esxA* e *esxB* contidos na RD1. Fortune et al. (2005), mostrou que a secreção de ESAT-6 e CFP-10 é mutuamente dependente, e tal fato contribui para a virulência micobacteriana. ESAT-6 e CFP-10 formam um complexo firmemente ligado, no qual ambas as proteínas adotam uma estrutura inteiramente dobrada, com dois terços desta em conformação helicoidal (RENSHAW et al., 2002).

A importância do ESAT-6 e do CFP-10 na patogenia e virulência da TB é confirmada pela inativação dos genes *esxA* e *esxB* em *M. bovis* e *M. tuberculosis* virulentos, a qual resultou na geração de espécies atenuadas (WARDS et al., 2000). Já a reintrodução da RD1 na cepa BCG-Pasteur, mostrou um aumento da virulência nesta cepa recombinante (PYM et al., 2002). Proteínas de baixo peso molecular entre 6 e 12 kDa (kilo-Dalton), como ESAT-6 e CFP-10, foram fortemente reconhecidas por células T isoladas de pacientes com TB (BOESEN et al., 1995), de camundongos e bovinos experimentalmente infectados com *M. tuberculosis* (ANDERSEN et al., 1995; POLLOCK e ANDERSEN, 1997). ESAT-6 ou ESAT-6 combinado ao CFP-10 têm-se mostrado como bons marcadores da infecção por *M. tuberculosis* (POLLOCK e ANDERSEN, 1997; RAVN et al., 1999; AREND et al., 2000; MAREI et al., 2005; ABRAMO et al., 2006; PORSA et al., 2007) e ainda foi observado por Pym et al. (2003) que vacinas contendo ESAT-6 e CFP-10 são importantes para proteção contra *M. tuberculosis* em cobaias. Além disso, nos últimos anos, estudos clínicos têm sido focados no uso de antígenos específicos do *M. tuberculosis*, como o ESAT-6, para identificar indivíduos contatos e pacientes com TB em países endêmicos (FLETCHER, 2007). O reconhecimento de ESAT-6 e CFP-10 por células do sistema imune durante a TB, bem como a ausência dessas proteínas no genoma do BCG, têm estimulado um grande interesse no potencial desses antígenos para o desenvolvimento de novas vacinas e novos métodos de diagnósticos.

1.3.2 PROTÉINA 16kDa, Hsp X, OU ALFA-CRISTALINA

Os microrganismos expostos a condições adversas à sua sobrevivência, como altas temperaturas, presença de toxinas, depleção de oxigênio, carência de nutrientes, entre outras, apresentam elevada síntese de proteínas de choque térmico

("heat shock proteins" - Hsp). Diversas Hsp envolvidas na sobrevivência do patógeno em um ambiente hostil têm sido descritas (MEHROTRA e BISHAI, 2001). Uma região genômica do *M. tuberculosis* foi caracterizada como DosR ("Dormancy Regulon"), a qual compreende 48 genes. Esses podem estar relacionados à adaptação do *M. tuberculosis* à gradual depleção de oxigênio e baixas doses de óxido nítrico (NO) (SHERMAN et al., 2001; VOSKUIL et al., 2003). Porém, a função da maioria das proteínas codificadas pela região DosR são desconhecidas (YUAN et al., 1996; PARK et al., 2003). Estudos sobre a cultura desses bacilos em condições de depleção de oxigênio mostram que a "heat shock protein X" (HspX), também conhecida como proteína 16-kDa (16 kilo Daltons) ou alfa-cristalina homóloga (Acr ou Rv2031c) (VERBON et al., 1999), é altamente expressa durante este estado (YUAN et al., 1996; ROSENKRANDS et al., 2002). Durante esta fase não-replicativa e de depleção de oxigênio, a expressão da proteína 16kDa pode chegar até 25% do total de proteínas micobacterianas expressas nessas circunstâncias (CACCAMO et al., 2002).

De acordo com Cunningham e Spreadbury (1998), a partir do padrão de localização da proteína 16kDa na célula, poderia se inferir que esta teria múltiplas funções, contribuindo para estabilização celular durante o estágio de latência do bacilo. Quando sujeito às condições anaeróbicas, presentes no granuloma, o *M. tuberculosis* induz uma maciça expressão da proteína 16kDa, a qual pode estar relacionada à densidade da parede celular micobacteriana, além de atuar como uma chaperona (WILKINSON et al., 1998), ou seja, proteínas atuantes na regulação de outras proteínas.

Ainda são escassos os estudos sobre o potencial imunogênico dos antígenos codificados pela DosR (ROUPIE et al., 2007). É conhecido que a proteína 16kDa é bastante imunogênica para células B, como mostrado pela presença de anticorpos específicos para esta em 70% de pacientes com TB pulmonar escarro-positivos e 50% escarro-negativos, e ainda foi detectada a presença desses anticorpos em indivíduos com TB latente (RAJA et al., 2002; DEMISSIE et al., 2006). Já com relação à imunidade por células T, tem sido relatado que células T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com TB reconhecem epítomos da proteína 16kDa (CACCAMO et al., 2002; CACCAMO et al., 2003). Embora seja classificada como uma proteína de choque térmico, uma classe de proteínas amplamente distribuída, a proteína 16kDa foi identificada somente no *M. bovis* BCG e no complexo *M. tuberculosis* (YUAN et al.,

1996; OFTUNG et al., 1998). Porém, no trabalho de Demangel et al.(2005) a proteína 16kDa foi expressa em menor grau pelo *M. bovis* BCG, quando comparada à alta expressão de outros antígenos, como os membros do complexo antigênico 85. Geluk et al. (2007) observaram que a produção de IFN- γ em resposta a proteína 16kDa foi significativamente maior nos indivíduos PPD positivos, expostos ao *M. tuberculosis*, em relação aos indivíduos vacinados com BCG, não expostos a esse bacilo, em contraste, nenhuma diferença foi encontrada na resposta imunológica ao antígeno 85B nesses dois grupos. Ao analisar a resposta imunológica de humanos e camundongos a vários antígenos associados à TB latente, Lin et al. (2007) encontram que a vacinação com BCG em humanos e camundongos, falhou em induzir uma resposta significativa a alguns antígenos de latência codificados pela DosR. Contudo, foi observada uma resposta imunológica ao 16kDa em indivíduos com suspeita de exposição ao *M. tuberculosis* e em camundongos vacinados com DNA plasmidial que codificava antígenos de latência.

A resposta imunológica aos antígenos de latência pode ser associada ao controle da TB latente, assim torna-se necessário incorporar os antígenos codificados pela DosR, como a proteína 16kDa, na construção de novas vacinas e novos métodos de diagnóstico para TB.

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA TUBERCULOSE

Os pulmões e as vias aéreas superiores são superfícies mucosas usualmente acometidas por infecções, assim a resposta imunológica nestes locais torna-se importante para prevenção e eliminação dos agentes patogênicos (KYD *et al.*, 2001). Ao ser inalado pelo hospedeiro o *M. tuberculosis* tem predileção para se instalar nos tecidos pulmonares, por se tratar de um sítio rico em oxigênio (RAJA, 2004). Nos pulmões o *M. tuberculosis* reside dentro das lesões granulomatosas, podendo causar cavitações neste órgão, devido à alta carga bacteriana e a forte resposta imunológica local. A destruição do tecido pulmonar prejudica suas funções e facilita a disseminação das micobactérias para outros órgãos e para o meio ambiente (KAUFMANN, 2005).

1.4.1 IMUNIDADE CELULAR

O *M. tuberculosis* é um exemplo clássico de patógeno que desencadeia como resposta protetora a imunidade mediada por células (RAJA, 2004). A eliminação dessa infecção bacteriana depende, sobretudo, do sucesso da interação entre células imunológicas como as apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e linfócitos T.

A resposta imunológica contra TB é iniciada através do reconhecimento do *M. tuberculosis* pelos fagócitos presentes no tecido pulmonar. Neste estágio inicial, ocorre envolvimento de vários receptores presentes na superfície das células do hospedeiro. Os receptores do complemento são responsáveis pelo reconhecimento de bactérias opsonizadas, já os receptores de manose e os receptores scavengers conseguem se ligar a bactérias não opsonizadas. Os receptores do tipo Toll (TLR) e moléculas CD14 também são fundamentais para o reconhecimento do *M. tuberculosis* (CREVEL et al., 2002). Aproximadamente dez tipos de TLR foram identificados em humanos, aqueles como TLR2, TLR4 e TLR9 podem estar envolvidos no reconhecimento de peptidoglicanos e lipopeptídios bacterianos (19 kDa), endotoxinas de bactérias gram-negativas e DNA bacteriano, respectivamente (CREVEL et al., 2002; DOHERTY e ARDITI, 2004). Após o reconhecimento, ocorre a fagocitose do patógeno e/ou de seus produtos bacterianos pelas células dendríticas pulmonares e macrófagos alveolares, desencadeando a ativação celular e produção de citocinas. A imunidade celular se desenvolve depois de duas a seis semanas de infecção, resultando em um fluxo aumentado de linfócitos e monócitos para o local, na ativação de macrófagos e na formação do granuloma.

As interações iniciais entre o microrganismo e o hospedeiro podem determinar se a fagocitose efetiva eliminará o patógeno, se a bactéria induzirá morte celular no fagócito, ou se o microrganismo adaptado ao ambiente intracelular hostil permanecerá dentro do fagócito e estabelecerá a infecção (RAUPACH e KAUFMANN, 2001). Os macrófagos estimulados por citocinas, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IFN- γ , podem produzir moléculas microbicidas que auxiliam na morte da bactéria. Essas citocinas podem induzir a produção de óxido nítrico e intermediários reativos de nitrogênio (RNI) através da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (NOS2) (DING et al., 1988). Espécies intermediárias reativas de oxigênio (ROI) também são utilizadas por macrófagos murinos como

moléculas microbidas, porém na infecção com *M. tuberculosis*, os RNI ganham maior destaque na eliminação dessa bactéria pelos macrófagos (RAUPACH & KAUFMANN, 2001). Wang et al. (1998) demonstraram que os níveis de NO liberados e a produção de RNI por macrófagos alveolares em cultura eram maiores em pacientes com TB ativa em relação aos indivíduos controles.

Dentro dos macrófagos a bactéria reside em fagossomos, porém a relação entre o *M. tuberculosis* e essas células depende da habilidade do patógeno em evitar a biogênese do fagolisossomo (VERGNE *et al.*, 2004). Os microrganismos fagocitados sofrem degradação por hidrolases presentes no interior dos lisossomos, os quais se fundem as vesículas fagocíticas que contém o patógeno. A prevenção da fusão fagolisossomal é um mecanismo pelo qual *M. tuberculosis* consegue sobreviver dentro do macrófago, impedindo a acidificação do fagossomo. Os mecanismos responsáveis por essa evasão ainda não estão claros, embora algumas moléculas, possivelmente envolvidas nesse processo, já tenham sido identificadas como sulfatos micobacterianos e glutamina sintetase. Também é citado que pode ocorrer a modulação da membrana fagossomal como meio de impedir a fusão do lisossomo ao fagossomo (FLYNN, 2004). Além de atuar no mecanismo de formação do fagolisossomo, o *M. tuberculosis* pode modular a indução da apoptose dentro dos fagócitos (MENAKER e JONES, 2003). Ao inibir a morte celular programada, o microrganismo consegue evadir a apresentação de antígenos através da fagocitose de vesículas apoptóticas, contendo os antígenos patogênicos, por outras células apresentadoras de antígenos (APCs).

Mesmo os macrófagos sendo considerados como as principais células infectadas por *M. tuberculosis*, têm sido proposto que existem outras populações celulares que abrigam este bacilo e essas células podem ser importantes para o desenvolvimento da doença (PALOMINO, LEÃO e RITACCO, 2007). Os neutrófilos podem ser considerados como esse tipo de célula, porém seu papel na TB ainda não é bem estabelecido. Essa célula poderia contribuir para o controle da infecção através da produção de quimiocinas (RIEDEL e KAUFMANN, 1997), da indução da formação do granuloma (EHLERS, 2003) e da transferência de moléculas microbianas para macrófagos (TAN et al., 2006). Outros trabalhos mostram que os neutrófilos podem atuar mais no desenvolvimento da patologia que na proteção do hospedeiro. Camundongos susceptíveis a TB tiveram um grande número de neutrófilos acumulados em suas lesões quando comparados aos camundongos

resistentes a doença (ERUSLANOV et al., 2005). Esse evento parece ser influenciado pela expressão diferencial de moléculas que são quimiotáticas para neutrófilos (KELLER et al., 2006). No sítio de multiplicação do *M. tuberculosis*, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem, seguidos de células natural killer (NK), células T γ/δ e α/β (RAJA, 2004).

As células dendríticas exibem uma habilidade única de ingerir o patógeno no sítio da infecção e de migrar até os linfonodos, onde apresentam os antígenos capturados para as células T (BANCHEREAU et al., 2000). Segundo os achados de Walker et al. (2007) proteínas micobacterianas de choque térmico têm papel fundamental na indução de citocinas e na maturação de células dendríticas. Wolf et al. (2007) mostraram que camundongos infectados com *M. tuberculosis* apresentavam células dendríticas mielóides como a maior população de células infectadas com esta bactéria, nos pulmões e nos linfonodos. Na TB, as células dendríticas infectadas com a micobactéria estão principalmente envolvidas em primar as células T, após migrarem dos pulmões para os linfonodos. No entanto, o *M. tuberculosis* pode usar as células dendríticas como veículo para se disseminar dentro do organismo hospedeiro e alcançar os tecidos linfóides (HERMANN e LAGRANGE, 2004).

A apresentação de antígenos micobacterianos no linfonodo realizada por células dendríticas, infectadas com *M. tuberculosis*, estimula linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ a se desenvolverem principalmente em células efetoras do perfil Th1 (T helper 1). As subpopulações de linfócitos T, como os linfócitos T CD4⁺, representam um conjunto de células com função crucial no controle da TB. Essas células atuam na produção de citocinas, principalmente IFN- γ , após serem estimuladas com antígenos micobacterianos. As células T CD8⁺, quando ativadas, também produzem citocinas e ainda lisam células infectadas (STENGER e MODLIN, 1999).

A ativação de células T CD4⁺ é essencial para formação do granuloma na infecção micobacteriana (SAUNDERS et al., 2002). A apresentação dos antígenos micobacterianos, usualmente contidos nos fagossomos, é realizada através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II presentes nas APCs. Como resultado desta apresentação as células T CD4⁺ secretam interleucina 2 (IL-2), principal fator de crescimento para célula T, e IFN- γ , um importante ativador de monócitos/macrófagos (VANHAM et al., 1997). Em humanos infectados com o vírus

HIV, tem sido demonstrado que a perda de células T CD4⁺ aumenta fortemente a susceptibilidade ao desenvolvimento da TB ativa ou de ocorrer a reativação da doença (SELWYN et al., 1989). Em modelos murinos com infecção latente por *M. tuberculosis*, a depleção de células T CD4⁺ também causou rápida reativação da doença (SCANGA et al., 2000). Camundongos deficientes em células T CD4⁺ sucumbiram à TB aguda, ocorrendo um atraso na produção de IFN- γ e na expressão de NOS2 (CARUSO et al., 1999).

Células T CD8⁺ específicas para micobactérias são induzidas em resposta ao *M. tuberculosis* e essas podem reconhecer macrófagos infectados (LAZAREVIC e FLYNN, 2002; KAMATH et al., 2004). Estas células reconhecem antígenos, freqüentemente derivados do citoplasma, apresentados via moléculas de MHC de classe I. Estudos sugerem que o bacilo dentro do fagossomo pode ter acesso ao citoplasma, talvez por poros encontrados nas membranas desse vacúolo (MAZZACCARO et al., 1996; TEITELBAUM et al., 1999). A atividade citotóxica de células T CD8⁺ envolve pelo menos dois mecanismos: apoptose via Fas-Fas ligante e a morte de células infectadas via perforinas e granzimas (STENGER et al., 1997). Em humanos, as células T CD8⁺ podem matar a micobactéria intracelular via a produção do peptídeo antimicrobiano granzina (STENGER et al., 1998). As células T CD8⁺ específicas para *M. tuberculosis* também estão envolvidas na produção de citocinas, particularmente o IFN- γ e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (LI et al., 1997; LALVANI et al., 1998). Foi descrito que os níveis de IFN- γ nos pulmões de camundongos deficientes em células T CD4⁺ foram similares aos animais controles, compensados pela produção de IFN- γ por células T CD8⁺ (Raja, 2004). Taha et al. (1997) encontrou um número elevado de células T CD8⁺ no lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes com TB ativa, e também foi verificado um aumento de células do BAL expressando RNAm para IFN- γ e IL-12. Mecanismos que regulam a produção de citocinas e a atividade citotóxica das células T durante a TB ainda não são bem conhecidos (SUD et al., 2006). O repertório antigênico para células T CD8⁺ e o mecanismo de apresentação de antígenos do *M. tuberculosis* por moléculas de MHC de classe I presentes nas células dendríticas e macrófagos também não estão bem definidos (BOOM, 2007). Os achados de Lazarevic, Nolt e Flynn (2005) indicaram que a função das células T CD8⁺ depende do estágio da infecção por *M. tuberculosis*.

Outro conjunto de linfócitos T que podem atuar na resposta imunológica contra a TB são as células T com TCR do tipo γ/δ . Em geral essas células não são restritas às moléculas de MHC, algumas podem ser CD8+ e funcionarem como células citotóxicas (RAJA, 2004). Células T γ/δ reativas ao *M. tuberculosis* podem ser encontradas no sangue periférico de indivíduos sadios PPD positivo, estas células são citotóxicas para monócitos que apresentam antígenos micobacterianos e ainda secretam citocinas que estão envolvidas na formação do granuloma (MUNK et al., 1990). Segundo os estudos de Ladel et al. (1995), este tipo de linfócitos T são importantes para proteção dos pacientes com infecção latente, sendo que tanto as células T γ/δ quanto as células T α/β são essenciais para a secreção de IFN- γ na TB.

As células natural killer (NK) também desempenham função importante na imunidade contra TB atuando tanto na resposta inata quanto na adaptativa. NK humanas têm mostrado um aumento na citotoxicidade para macrófago infectados com *M. tuberculosis*. Elas também otimizam a habilidade de células T CD8+ em produzirem IFN- γ e lisarem células infectadas com micobactérias (VANKAYALAPATI et al., 2002; VANKAYALAPATI et al., 2004). Porém, alguns trabalhos mostram que apesar das células NK se tornarem ativadas e serem uma fonte de IFN- γ nas infecções micobacterianas, sua depleção não afeta a susceptibilidade do hospedeiro em relação a esses patógenos (TEIXEIRA, MUNCH e KAUFMANN, 1995; FLORIDO et al., 1997; JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2003).

1.4.2 IMUNIDADE HUMORAL

A resposta humoral também está envolvida na proteção contra a TB. Células B podem funcionar apresentando antígenos e ativando células T, além de atuarem na produção de imunoglobulinas. Na TB, anticorpos participam da neutralização de toxinas, opsonização, ativação do complemento, produção de citocinas e da citotoxicidade dependente de anticorpos (PALOMINO, LEÃO e RITACCO, 2007). Muitos trabalhos indicam que anticorpos anti-micobacterianos desempenham um importante papel em vários estágios da infecção (HOFT et al., 2002; WILLIAMS et al., 2004; DE VALLIÉRE et al., 2005). No estudo de De Vallière et al. (2005) foi mostrado que anticorpos específicos aumentam a internalização e a morte do BCG

pelos neutrófilos e monócitos/macrófagos. E ainda anticorpos induzidos por BCG aumentam a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e a produção de IFN- γ por esses linfócitos. A apresentação de antígenos nos linfonodos resulta na interação entre células T e B determinando a produção de diferentes isótipos de imunoglobulina (Ig). O IFN- γ é um forte indutor para secreção de IgG2a *in vitro* por células B murinas estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano, e concomitantemente suprime a produção de IgG3, IgG1, IgG2b e IgE (SNAPPER, PESCHEL E PAUL, 1988). Vários trabalhos mostraram que imunoglobulinas como IgG, IgM e IgA, estão envolvidas na resposta imunológica contra antígenos micobacterianos (GEVAUDAN et al., 1992; GUPTA et al., 1995; KUNTER et al., 2003).

1.4.3. GRANULOMA

A formação do granuloma é a principal característica da infecção por *M. tuberculosis* (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003). O granuloma é desenvolvido em resposta a estimulação antigênica crônica local e pode ser observado em outras doenças como a esquistossomose, hanseníase e leishmaniose (MODLIN e REA, 1988; BOROS, 1999). Na TB a formação do granuloma é acompanhada de uma intensa atividade celular com objetivo de controlar o número de bacilos no pulmão. Quando a bactéria entra no parênquima pulmonar e infecta os macrófagos residentes, induz uma série de sinais inflamatórios. Esses sinais são importantes para o tráfego celular e conseqüente formação do granuloma. O granuloma é uma estrutura composta por vários tipos celulares, como macrófagos, células T CD4⁺ e CD8⁺ e um pequeno número de células B (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2001). Essas células migram da corrente sanguínea, passando através do tecido pulmonar para o sítio da infecção. As células T inicialmente podem interagir com macrófagos infectados e ativar essas células para controlarem a doença (ALGOOD, LINN e FLYNN, 2005). Em humanos, os macrófagos podem se diferenciar em células gigantes multinucleadas, contribuindo para evitar a dispersão das bactérias presentes no pulmão do hospedeiro (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003). O granuloma promove a criação de um ambiente local, no qual as células imunológicas interagem e eliminam os bacilos, e ainda proporciona um sítio privado de oxigênio e nutrientes. Além disso, a formação de um foco inflamatório no pulmão, como ocorre

na área granulomatosa, impede a disseminação da infecção micobacteriana para as outras partes do tecido pulmonar e também para outros órgãos (ALGOOD, LIN e FLYNN, 2005). No entanto essa tentativa de conter a infecção pode causar problemas adicionais ao hospedeiro. Muitas vezes, a estrutura do granuloma apresenta um foco necrótico central. Em humanos esse processo pode progredir para uma necrose caseosa, na qual parte do tecido pulmonar é destruído formando cavidades neste órgão. O granuloma caseoso contém macrófagos apoptóticos e granulócitos, enquanto que as células T produzem perforinas e granzimas no local, e ainda podem ser encontradas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, contribuindo para necrose celular (CHAN, CHAN e SCHLUGER, 2001; FLORIDO, COOPER e APPELBER, 2002). Produtos micobacterianos, como ESAT-6 podem também causar a lise de células pulmonares e facilitar a disseminação das bactérias (HSU et al., 2003). Caso a estrutura do foco necrótico caseoso se torne liquefeita, pode ocorrer replicação extracelular do *M. tuberculosis*, facilitando deste modo a transmissão da TB para outros indivíduos (COSMA, SHERMAN e RAMAKRISHNAN, 2003). A formação de cavidades nos pulmões através da “erosão do tecido” permite o contato entre as bactérias e a corrente sanguínea, acarretando o espalhamento dessas pelo organismo (SAUNDERS e BRITTON, 2007). Também pode ser observada a fibrose do granuloma, quando ocorre um controle da infecção micobacteriana e uma limitação do processo inflamatório. Na infecção latente um ou mais granulomas controlando a infecção são vistos e esses podem estar calcificados (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003). Ainda assim, essa destruição do tecido pulmonar pode ser prejudicial para as funções respiratórias do hospedeiro.

Não é conhecido como o bacilo consegue sobreviver dentro do granuloma, onde se encontra uma variedade de células imunológicas ativadas. Porém, esta ativação pode fracassar na eliminação do *M. tuberculosis*, e o bacilo latente pode persistir nos pulmões por décadas. Em uma minoria de indivíduos infectados com TB o granuloma pode falhar por vários motivos, permitindo a reativação da doença.

4.4 CITOCINAS NA TUBERCULOSE

Os mecanismos de imunidade protetora contra TB ainda não estão totalmente claros, mas há o envolvimento da produção de citocinas e quimiocinas, proteínas

secretadas por células estimuladas que participam da imunidade inata e adquirida. Essas moléculas são capazes de regular várias funções celulares, como resposta inflamatória e a migração de leucócitos do sangue para os tecidos (RAJA, 2004; MACKAY, 2001).

Na maioria dos indivíduos infectados com *M. tuberculosis* o controle imunológico é baseado no tipo de resposta envolvendo células T do perfil Th1 (SALGAME, 2005). O desenvolvimento deste padrão de resposta envolve a expressão de uma série de citocinas específicas. Citocinas como IFN- γ e IL-2 são secretadas por células Th1 e estão envolvidas na resposta imunológica celular protetora contra o *M. tuberculosis*. Já as citocinas IL-4, IL-5, e IL-13 são produzidas por células Th2, este outro tipo de perfil imunológico promove a imunidade humoral (DLUGOVITZKY et al., 2000) e ainda atua na regulação da resposta contra TB. Segundo Ribeiro-Rodrigues et al. (2002), citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-8 e IL-6, presentes no escarro de pacientes com TB, podem estar relacionadas com a doença pulmonar ativa, além de serem úteis como possíveis marcadores da evolução da resposta imunológica após o tratamento quimioterápico da TB.

A resposta do tipo Th1 é fortemente influenciada pela produção de IL-12, esta citocina é produzida por macrófagos e células dendríticas que fagocitaram o *M. tuberculosis*. A molécula de IL-12 é um importante estímulo para células T desencadearem a produção de IFN- γ (FLYNN, 2004). O IFN- γ desempenha várias funções, ativa fagócitos, estimula a apresentação de antígenos, e regula várias funções celulares, como proliferação, apoptose e adesão celular. Deste modo, a ação do IFN- γ requer um complexo e sofisticado programa molecular de expressão de vários genes, assegurando que suas potentes funções imunomodulatórias sejam exercidas somente na presença de infecções patogênicas (RELJIC, 2007). Embora a produção exclusiva de IFN- γ seja insuficiente para controlar a infecção por *M. tuberculosis*, esta molécula é fundamental para proteção contra este patógeno (RAJA, 2004). Em indivíduos com várias deficiências nas vias de produção e/ou receptores de IFN- γ são mais predispostos a infecções micobacterianas, incluindo a TB (BAI et al., 2004). A citocina IFN- γ é produzida por células Th1 CD4⁺, T CD8⁺ e células NK, e tem função importante no controle da infecção pelo *M. tuberculosis*. Uma das funções do IFN- γ é atuar na via de produção de NO por macrófagos limitando o crescimento de micobactérias (COOPER et al., 2002). Em camundongos

deficientes de IFN- γ e/ou NO o curso da infecção por *M. tuberculosis* é dramaticamente alterado, durante o período inicial da infecção ocorre aumento do recrutamento de granulócitos para o granuloma e aumento na proporção de linfócitos T CD4⁺ ativados, porém os linfócitos ativados não foram identificados como sendo antígenos-específicos (PEARL et al., 2001). Isso contribui provavelmente para o dano tecidual e o aparecimento de lesões necróticas. Assim a ausência de IFN- γ e /ou NO pode desencadear uma doença severa, não como consequência de um crescimento bacteriano descontrolado, mas sim como resultado de uma ativação de linfócitos desordenada e do aumento das lesões granulomatosas (PEARL et al., 2001). De acordo com PAI, RILEY e COLFORD (2004), altos níveis de IFN- γ são indicativos de infecção por *M. tuberculosis*. Outro importante papel do IFN- γ é induzir a expressão de moléculas do MHC classe II, influenciando no aumento da apresentação de antígenos para células T CD4⁺. A molécula de IFN- γ é a principal ativadora de macrófagos e também é responsável pelo recrutamento de linfócitos T, atuando na produção de quimiocinas, desta forma participa criticamente da eliminação do *M. tuberculosis* (PAI, RILEY e COLFORD 2004).

O TNF- α é uma citocina pleotrópica, fundamental na resposta imunológica contra TB (FLYNN et al., 1995), o qual induz uma forte resposta celular, incluindo febre, lesão tecidual e ativação de macrófagos (BEUTLER e CERAMI, 1986). Produtos micobacterianos induzem monócitos/macrófagos a produzirem TNF- α , assim ele pode atuar no aumento da fagocitose, e da capacidade dessas células em eliminar bactérias (VANHAM et al., 1997). Além de monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos T produzem TNF- α (BARNES et al., 1993; HENDERSON, WATKINS e FLYNN, 1997; LADEL et al., 1997). Em camundongos, TNF- α e IFN- γ estão envolvidos na síntese de moléculas microbianas, como NO, por monócitos/macrófagos (VANHAM et al., 1997). Foi visto que o TNF- α também atua na indução da apoptose em macrófagos alveolares infectados com *M. tuberculosis* (KEANE et al., 1997). Em camundongos deficientes em TNF- α infectados com este bacilo, ocorreu uma desregulada formação do granuloma, resultando em um grande acúmulo de células e micobactérias nos pulmões, bem como uma extensiva necrose e infiltração de neutrófilos (BEAN et al., 1999). A deficiência na expressão de TNF- α em camundongos infectados com *M. tuberculosis* alterou o padrão de expressão

de quimiocinas (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003), assim o TNF- α pode influenciar a regulação do gradiente de quimiocinas local, e subsequente recrutamento de células para a formação do granuloma. O TNF- α ainda participa da resposta imunopatológica e, freqüentemente está relacionado aos danos nos tecidos pulmonares provocados pela infecção. A superprodução de TNF- α pode causar imunopatologias, enquanto que a sua neutralização pode reativar a doença latente (JACOBS et al., 2007). Em pacientes com TB, o aumento dessa citocina pode acarretar em um agravamento clínico da doença (BEKKER et al., 1998). Nos estudos de Bekker et al. (2000) camundongos deficientes em TNF- α que foram infectados com altas dose *M. bovis* BCG recombinante, o qual secretava TNF- α murino (BCG-TNF), conseguiram eliminar as bactérias, porém houve uma inflamação severa nos pulmões e no baço e uma diminuição no tempo de sobrevivência desses animais, em comparação aos camundongos deficientes em TNF- α , os quais receberam apenas BCG. Aqueles animais cuja infecção foi realizada com baixas doses de BCG-TNF, tiveram o crescimento dos bacilos controlado, o granuloma foi pequeno e diferenciado, o tamanho do baço não foi alterado, e esses sobreviveram. Esses resultados sugerem que a quantidade de TNF- α no sítio da infecção, determina se o potencial dessa citocina será destrutivo ou protetor. De acordo com o nível de produção do TNF- α pode ocorrer aumento da patologia e necrose nos pulmões (FLYNN, 2004).

A interleucina-2 (IL-2) é crucial para gerar resposta imunológica, pois induz a expansão clonal de linfócitos T específicos para um determinado antígeno. A secreção de IL-2 por células T CD4+ é um importante parâmetro a ser analisado e muitos estudos têm demonstrado que IL-2 pode influenciar no curso da infecção micobacteriana, atuando sozinha ou em combinação com outras citocinas (BLANCHARD et al., 1989). Segundo Khanna, Srivastava e Kumar (2003), uma disfunção na produção de IL-2 ou em seu receptor (IL-2R), os quais atuam na resposta mediada por células na infecção por *M. tuberculosis*, poderia contribuir para progressão da infecção primária ou reativação da doença. Outros estudos mostraram que a expressão do gene para IL-2 estava aumentada em indivíduos com TB ativa em relação aos indivíduos controles (LAI et al., 1997). Trabalhos de Fan et al. (2006) sugerem que a construção de uma vacina BCG recombinante

expressando ESAT-6 e IL-2 humana pode aumentar a resposta do tipo Th1 em camundongos.

Monócitos/macrófagos podem secretar citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , quando expostos a antígenos micobacterianos (WALLIS, AMIR e ELLNER, 1990). No entanto, a IL-6 pode funcionar tanto como citocina pró-inflamatória ou como antiinflamatória (VANHEYNINGEN, COLLINS e RUSSELL, 1997), sendo produzida nos estágios iniciais da infecção micobacteriana (LAW et al., 1996; OKAMURA et al., 1998). Como citocina pró-inflamatória a IL-6 pode ser importante no controle da doença, ao recrutar células para o sítio da infecção por *M. tuberculosis* (LAW et al., 1996). Em pacientes com TB pulmonar HIV positivos, foi encontrada, no fluido de seus lavados broncalveolares, altas concentrações de citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-8 (MWANDUMBA et al., 2007). Outros estudos indicaram que camundongos deficientes em IL-6 foram mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis*, por apresentarem níveis de IL-4 aumentados e diminuição nos níveis de IFN- γ . (LADEL et al., 1997; SAUNDERS et al., 2000). A IL-6 pode ter efeitos opostos aos citados acima, como mostraram os trabalhos de Schindler et al. (1990) esta citocina foi capaz de inibir a produção de TNF- α e IL-1, e promover o crescimento *in vitro* de *Mycobacterium avium* (SHIRATUCHI et al., 1991). De acordo com os estudos de VanHeyningen, Collins e Russell (1997), IL-6 produzida por macrófagos infectados com micobactérias inibiu ativação de células T *in vitro*.

Entre as citocinas produzidas por células T, a IL-10 é considerada uma importante citocina reguladora da resposta imunológica. Células T CD4⁺CD25⁺ participam da regulação da resposta imunológica, secretando IL-10 e fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β)(MCHUGH e SHEVACH 2002; JONULEIT e SCHMITT, 2003). Estas células podem atuar na resposta inume contra doenças infecciosas facilitando a persistência do patógeno (SATOGUINA et al., 2002; VAHLENKAMP, TOMPKINS e TOMPKINS 2004) ou modulando a resposta imunológica na infecção (HORI, CARVALHO e DEMENGEOT, 2002; MONTAGNOLI et al., 2002). Mason et al. (2007) observaram que células T CD4⁺CD25⁺ produziram IL-10 e TGF- β em camundongos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv, e a neutralização de IL-10 e TGF- β resultou no aumento da produção de IFN- γ . Durante a TB a IL-10 promove a desativação de macrófagos, incluindo diminuição na produção de IL-12 e diminuição nos níveis de IFN- γ produzido por células T (RAJA,

2004). A IL-10 é capaz de afetar a atividade antimicrobacteriana de macrófagos *in vitro*, inibindo a atividade enzimática relacionada à produção de óxido nítrico (KWON, 1997). De acordo com os achados de Boussiotis et al. (2000) pacientes com TB que não eram reativos ao teste cutâneo do PPD, produziram níveis elevados IL-10, mas falharam na produção de IFN- γ e proliferação celular quando estimulados *in vitro* com PPD. As citocinas IL-10 e TGF- β suprimem a resposta imunológica inibindo a função de macrófagos resultando no aumento do crescimento intracelular da bactéria (CHANTRY et al., 1989; TOOSI et al., 1995; HERNANDEZ-PANDO et al., 1997; MURRAY et al., 1997). A expressão de IL-10 têm sido associada com o aumento da sobrevivência celular, e inibição da apoptose (BINGISSER et al., 1996; COHEN et al., 1997). Essas observações mostram que uma inapropriada secreção de IL-10 e TGF- β e a inibição da apoptose de macrófagos infectados podem prejudicar a resposta imunológica adequada na TB (MUSTAFA et al., 2007).

Células Th2 podem produzir citocinas durante a infecção por *M. tuberculosis*. No entanto, o papel das células Th2 na TB ainda é controverso, pois as citocinas produzidas por elas, como a IL-4 são altamente bioativas e geralmente produzidas em baixos níveis, tornando a sua detecção problemática (Demissie et al., 2006). Shauf et al. (1993), Sanchez et al. (1994) e Crevel et al. (2002) detectaram aumento na produção de IL-4 em indivíduos com TB, especialmente naqueles com doença cavitária. Demissie et al. (2004) sugeriram que a longa proteção contra TB no estado latente é associada ao aumento da expressão de citocinas produzidas por células Th1 e supressão da atividade de citocinas produzidas por células Th2. Logo, níveis elevados de citocinas Th2, como IL-4 em pacientes com TB, poderiam influenciar na reativação da doença. A IL-4 pode prejudicar a imunidade do tipo Th1 e guiar para uma inapropriada ativação de macrófagos. Os efeitos da IL-4 incluem a redução da atividade antimicrobacteriana do TNF- α , o qual influencia a apoptose de células infectadas, redução na atividade da enzima NOS induzida, aumentando a disponibilidade de ferro para o *M. tuberculosis* e elevando a proliferação de células T regulatórias antígeno-específicas FOXP-3⁺, e também a citocina IL-4 pode aumentar a toxicidade do TNF- α e guiar para fibrose pulmonar e aumento da imunopatologia (ROOK, 2007). Segundo Wu et al. (2007a) a expressão de RNAm para IL-4 e IL-4 δ 2 foram mensuradas no PBMC de pacientes com TB, pacientes com pneumonia e

indivíduos controles sadios, e encontrou-se que a expressão de RNAm para IL-4 e para IL-4 δ 2 estava significativamente diminuída nos pacientes com TB e pneumonia comparados aos controles. Esses resultados podem indicar que em humanos a forte resposta Th2 não está associada à TB. A presença de uma resposta envolvendo a produção de IFN- γ e citocinas do tipo Th2 aos antígenos micobacterianos antes da infecção por *M. tuberculosis*, e o desenvolvimento de uma forte resposta com a produção de IL-4, durante a progressão da TB, são características de indivíduos os quais apresentam uma falha na eficiência da vacina BCG (ROOK, 2007).

1.4.5 QUIMIOCINAS NA TUBERCULOSE

Citocinas quimiotáticas ou quimiocinas são amplamente responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para o sítio da infecção (CREVEL, 2002). As moléculas de quimiocinas atuam no tráfego celular e são potentes ativadoras de leucócitos, e ainda auxiliam na formação do granuloma, o qual desempenha importante função na resposta imunológica contra TB (MURPHY, 2001). O estabelecimento de um gradiente de quimiocinas é crucial para o recrutamento de células inflamatórias e conseqüente organização dessas no local da infecção, contribuindo para constituição do granuloma (SAUNDERS e BRITTON, 2007).

A resposta contra o *M. tuberculosis* inclui quimiocinas induzidas pela citocina IFN- γ , em especial a monocina induzida pelo interferon-gama (MIG ou CXCL9) e a proteína induzida pelo interferon-gama de 10kDa (IP-10 ou CXCL-10). Em estudos de Sauty et al. (1999) observou-se que o IFN- γ foi um forte indutor da acumulação de RNAm para IP-10 e MIG em células epiteliais brônquicas humanas normais. Essas quimiocinas atuam recrutando células T e células NK para o sítio da inflamação (DAJOTOY et al., 2004). IP-10 recruta células T para o sítio da inflamação e pode atuar na geração e na função de células T efetoras. A síntese de IP-10 pode influenciar na produção de IFN- γ e MIG, pois camundongos deficientes em IP-10 apresentavam níveis de MIG e IFN- γ reduzidos (DUFFOUR et al., 2002). De acordo com os achados de Raju et al. (2007), utilizando os ensaios de microarray com células obtidas do lavado broncoalveolar de pacientes com TB pulmonar ativa e indivíduos controles sadios, pôde-se observar que a expressão de genes para MIG e

receptor de IFN- γ estavam elevadas nesses pacientes quando comparados aos controles. Foi detectada a produção de IP-10 por macrófagos alveolares infectados com *M. tuberculosis in vitro*, mostrando-se como uma quimiocina importante para migração de células T γ/δ (FERRERO et al. 2003). As quimiocinas IP-10 e MIG são características da imunidade celular local, deste modo estão envolvidas na quimioatração de linfócitos T ativados, amplificando a resposta de células Th1 no sítio da infecção por *M. tuberculosis* (OKAMOTO et al., 2005). Células do lavado bronco-alveolar de indivíduos PPD positivos não vacinados com BCG apresentam altos níveis de proteínas ligantes ao receptor CXCR3, como IP-10 e MIG, após estimulação *in vitro* com o antígeno PPD (WALRATH et al., 2005).

A produção de IL-8 ou CXCL8 durante a infecção por *M. tuberculosis* pode ser responsável pela infiltração de neutrófilos e linfócitos, os quais participam da formação do granuloma, e também a produção elevada desta quimiocina contribui para destruição necrótica dos pulmões (ZHANG et al., 1995). A IL-8 é produzida primariamente por monócitos/macrófagos, e atua no recrutamento de células T e basófilos, sendo também fator de ativação de neutrófilo (MUNK e EMOTO 1995; RAJA, 2004). Zhang et al. (1995) demonstraram que IL-8 é induzida por macrófagos alveolares infectados com *M. tuberculosis*. Os trabalhos de O’Kane et al. (2007) mostraram que fibroblastos pulmonares humanos, cultivados com meio de cultura proveniente de monócitos infectados com *M. tuberculosis*, expressaram RNAm para IL-8. Já a inibição de TNF- α e IL-1 neste meio, diminuiu a indução de IL-8 à níveis pré-transcricionais. Os autores observaram ainda que níveis exógenos de IL-8 reduziram a sobrevivência do *M. tuberculosis* dentro de macrófagos, e a inibição de IL-8 estava associada à proliferação intracelular do patógeno. Culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos específicos de *M. tuberculosis*, revelaram um aumento na expressão de gene para IL-8 em pacientes com TB ativa em comparação aos pacientes com a doença latente (WU et al., 2007b).

RANTES ou CCL5 (“Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted”) é uma quimiocina produzida por várias células, incluindo células T e macrófagos, é preferencialmente quimiotática para células T CD4⁺, células T de memória (CD45RO) e monócitos (SCHALL et al., 1990; SCHALL, 1991). RANTES funciona ativando células T e monócitos, influenciando na formação do granuloma

(BADEWA et al., 2005). Saukkonen et al. (2002) demonstraram que RANTES compõe um grupo de quimiocinas que desempenham a função de inibir o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* em macrófagos alveolares de indivíduos infectados com HIV. Receptores para quimiocinas, como RANTES e proteína quimiotática de monócito – 1 (MCP-1), desempenham importante papel no tráfego de células para o sítio da infecção com o *M. tuberculosis* (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003). RANTES, IL-8 e MCP-1 foram detectadas em níveis elevadas no fluido do lavado broncoalveolar de pacientes com TB ativa (SADEK et al., 1998). Esplenócitos e macrófagos peritoneais obtidos de cobaias vacinados ou não com BCG foram infectados com *M. tuberculosis in vitro* e observou-se que os níveis de RNAm para RANTES e a sua expressão estavam aumentados nos animais vacinados com BCG em relação aos não vacinados, indicando que a vacinação com BCG em cobaias induziu a produção de RANTES in vitro (SKWOR et al., 2006).

A MCP-1 ou CCL2 atrai monócitos, células T de memória e células NK *in vitro*, é uma quimiocina produzida e, ao mesmo tempo, atuante em monócitos e macrófagos (CREVEL et al., 2002). O *M. tuberculosis* induz preferencialmente a produção de MCP-1 por monócitos (KASAHARA et al., 1994). Zhu e Friedland (2006) observaram que a produção de MCP-1 por monócitos aumentou quando essas estavam infectadas com *M. tuberculosis* (H37Rv). Sadek et al. (1998) mostraram níveis elevados de MCP-1 no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares humanos infectados com *M. tuberculosis* H37Ra. Camundongos deficientes para o receptor de MCP-1 (CCR2) mostraram uma redução na formação do granuloma, supressão da produção de citocinas do tipo Th1 (BORING et al., 1997) e diminuição da sobrevivência após a infecção com *M. tuberculosis* (PETERS et al., 2001). O aumento de MCP-1 em pacientes com TB pulmonar pode resultar em forte indução de resposta imunológica celular (HASAN et al., 2005).

A resposta imunológica contra *M. tuberculosis* é complexa e multifacetada. O estudo de diversos parâmetros da imunidade em resposta a diferentes antígenos do *M. tuberculosis* e a compreensão da dinâmica de produção de citocinas e quimiocinas nessa infecção podem auxiliar no conhecimento da doença em seus diferentes estágios.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi estudar os níveis de quimiocinas no plasma humano durante a TB, e avaliar a produção *in vitro* de citocinas e quimiocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells) em resposta a antígenos do *M. tuberculosis* através do método citométrico de esferas ordenadas (CBA-Cytometric Bead Array).

Os objetivos específicos foram:

2.1) Avaliar os níveis das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8, RANTES e MCP-1 no plasma humano utilizando o método de CBA, em indivíduos controles sadios vacinados com BCG, em pacientes com TB ativa não tratada, em pacientes com TB sob tratamento e em pacientes com TB que já haviam finalizado o tratamento quimioterápico;

2.2) Avaliar a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 e das quimiocinas mencionados anteriormente utilizando o método de CBA, encontradas no sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos sadios controles vacinados com BCG, de indivíduos que mantém contato com pacientes que apresentavam TB ativa, de pacientes com TB ativa não tratada e de pacientes com TB que já haviam finalizado o tratamento quimioterápico. Essas culturas foram submetidas ao estímulo com os antígenos recombinantes específicos do *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10) e ao antígeno expressado principalmente durante a fase de latência do *M. tuberculosis* (16-kDa). Também foi verificado o possível papel desses antígenos na diferenciação entre os grupos estudados quanto à produção de citocinas e quimiocinas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

No Setor de Pneumologia da Policlínica Central de Juiz de Fora foram selecionados pacientes com TB pulmonar, diagnosticados através dos exames de radiografia dos pulmões e baciloscopia ou cultura. Para o estudo dos níveis de quimiocinas no plasma humano foram selecionados vinte e quatro pacientes com TB ativa não tratada (TBA), vinte e oito pacientes que estavam sob tratamento (TBST) e vinte pacientes, os quais já haviam finalizado o tratamento (TBT) (Tabela 1). Para o estudo da produção de citocinas e quimiocinas por PBMC em cultura estimulada com antígenos do *M. tuberculosis* foram selecionados dez pacientes com TB ativa não tratada (TBA) e dez pacientes tratados (TBT) (Tabela 2). O tratamento para a cura da TB, recebido por esses pacientes, teve duração de seis meses e foi realizado com isoniazida, rifampicina e pirazinamida.

Foram incluídos no estudo apenas os pacientes com diagnóstico da doença confirmado por baciloscopia ou cultura, além do exame clínico e da realização do exame radiológico, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Foram critérios de exclusão: AIDS, diabetes, hepatite, hipertensão, gravidez e alcoolismo. De acordo com a classificação proposta pela National Tuberculosis Association (1961), de envolvimento mínimo, moderado e severo do tecido pulmonar, os pacientes selecionados para o presente estudo, em sua maioria, apresentavam a forma moderada de TB pulmonar (Tabela 1, 2 e 3).

O grupo controle sadio (CS) vacinado com o BCG foi composto por trinta estudantes e funcionários da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (Tabela 4). As amostras desses indivíduos foram utilizadas no estudo dos níveis de quimiocinas no plasma humano. Já para o estudo da produção de citocinas e quimiocinas por PBMC em cultura estimulada com antígenos do *M. tuberculosis* foram selecionados treze indivíduos controles sadios (CS) vacinados com BCG e cinco indivíduos que mantinham contato (CT) com pacientes que apresentavam TB ativa (Tabela 5).

Todos os indivíduos selecionados para este estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme consta no parecer aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (nº. 174/2006).

Tabela 1 - Caracterização, tempo de tratamento e dados clínicos dos pacientes com tuberculose pulmonar, estudados quanto à produção de quimiocinas no plasma.

PACIENTES	IDADE	SEXO	VACINAÇÃO COM BCG	LESÕES		TEMPO DE TRATAMENTO (meses)
				PULMONARES	CAVIDADES	
TBA 04	23	F	ND	1 pulmão	ND	0m
TBA 20	20	M	NÃO	2 pulmões	ND	0m
TBA 23	35	M	SIM	ND	ND	0m
TBA 24	13	F	SIM	ND	ND	0m
TBA 25	30	F	NÃO	1 pulmão	ND	0m
TBA 27	45	M	SIM	1 pulmão	NÃO	0m
TBA 32	18	M	SIM	1 pulmão	SIM	0m
TBA 45	55	M	NÃO	1 pulmão	SIM	0m
TBA 47	51	F	SIM	1 pulmão	ND	0m
TBA 53	42	F	SIM	2 pulmões	SIM	0m
TBA 70	33	M	NÃO	1 pulmão	ND	0m
TBA 73	33	M	SIM	1 pulmão	ND	0m
TBA 91	46	M	NÃO	2 pulmões	ND	0m
TBA 96	31	F	SIM	ND	ND	0m
TBA 141	32	M	SIM	1 pulmão	> 4cm	0m
TBA 150	20	M	SIM	1 pulmão	ND	0m
TBA 151	73	M	NÃO	1 pulmão	ND	0m
TBA 159	33	M	NÃO	1 pulmão	4cm	0m
TBA 161	40	M	SIM	ND	ND	0m
TBA 162	30	M	SIM	1 pulmão	4cm	0m
TBA 165	30	M	ND	1 pulmão	> 4cm	0m
TBA 175	23	F	NÃO	1 pulmão	NÃO	0m
TBA 176	27	F	ND	1 pulmão	ND	0m
TBA 177	22	M	SIM	2 pulmões	SIM	0m
TBST 14	40	M	SIM	2 pulmões	SIM	1m
TBST 54	20	M	SIM	2 pulmões	SIM	1m
TBST 64	44	M	ND	1 pulmão	ND	1m
TBST 79	20	M	SIM	ND	ND	1m
TBST 81	13	F	SIM	ND	ND	1m
TBST 112	43	M	SIM	1 pulmão	SIM	1m
TBST 105	25	M	SIM	ND	ND	1m
TBST 107	32	M	ND	ND	ND	1m
TBST 127	17	F	SIM	2 pulmões	ND	1m
TBST 128	33	F	SIM	ND	ND	1m
TBST 07	54	M	ND	1 pulmão	SIM	2m
TBST 88	20	F	SIM	1 pulmão	ND	2m

TBST 111	29	M	SIM	ND	ND	2m
TBST 119	44	M	SIM	2 pulmões	ND	2m
TBST 148	27	F	NÃO	ND	ND	2m
TBST 98	42	F	SIM	ND	ND	2m
TBST 117	45	M	NÃO	ND	ND	3m
TBST 123	21	F	SIM	2 pulmões	ND	3m
TBST 124	25	M	NÃO	ND	ND	3m
TBST 173	32	M	SIM	1 pulmão	ND	3m
TBST 104	23	M	SIM	ND	ND	4m
TBST 146	33	M	SIM	2 pulmões	Multicavit.	4m
TBST 97	29	M	SIM	ND	ND	4m
TBST 101	65	M	SIM	ND	ND	4m
TBST 17	41	M	NÃO	ND	ND	5m
TBST 65	18	M	NÃO	1 pulmão	NÃO	5m
TBST 67	24	M	NÃO	1 pulmão	SIM	5m
TBST 139	65	M	SIM	2 pulmões	SIM	5m
TBT 37	75	F	SIM	1 pulmão	SIM	6m
TBT 39	43	M	SIM	ND	ND	6m
TBT 85	18	M	SIM	1 pulmão	ND	6m
TBT 108	16	F	SIM	2 pulmões	Multicavit.	6m
TBT 113	35	F	SIM	1 pulmão	NÃO	6m
TBT 150	20	M	SIM	1 pulmão	ND	6m
TBT 153	50	F	SIM	1 pulmão	4cm	0m a 6m
TBT 154	21	M	SIM	1 pulmão	>4cm	6m
TBT 155	22	M	SIM	1 pulmão	4cm	0m a 6m
TBT 156	21	M	SIM	1 pulmão	4cm	0m a 6m
TBT 157	72	M	SIM	1 pulmão	ND	0m a 6m
TBT 158	40	M	SIM	1 pulmão	SIM	0m a 6m
TBT 163	43	M	SIM	2 pulmões	ND	0m a 6m
TBT 164	49	F	SIM	ND	ND	0m a 6m
TBT 166	41	M	SIM	ND	ND	0m a 6m
TBT 167	37	M	SIM	ND	SIM	0m a 6m
TBT 168	26	F	SIM	ND	ND	0m a 6m
TBT 171	45	M	NÃO	ND	SIM	6m
TBT 172	45	F	SIM	1 pulmão	ND	6m
TBT 108	16	F	SIM	2 pulmões	Multicavit.	6m

ND – Não Disponível

Tabela 2- Caracterização, tempo de tratamento e dados clínicos dos pacientes com tuberculose pulmonar, estudados quanto à produção de citocinas e quimiocinas em cultura.

PACIENTES	IDADE	SEXO	VACINAÇÃO COM BCG	PPD (mm)	LESÕES PULMONRES	CAVIDADES	TEMPO DE TRATAMENTO (meses)
TBA 45	55	M	NÃO	X	1 pulmão	SIM	0m
TBA 47	27	M	SIM	X	ND	ND	0m
TBA 70	33	M	NÃO	X	1 pulmão	ND	0m
TBA 91	46	M	NÃO	X	2 pulmões	ND	0m

TBA 151	73	M	NÃO	X	1 pulmão	ND	0m
TBA 158	40	M	SIM	X	1 pulmão	SIM	0m
TBA 161	40	M	SIM	X	ND	ND	0m
TBA 162	30	M	SIM	X	1 pulmão	4cm	0m
TBA 164	49	F	SIM	X	ND	ND	0m
TBA 165	30	M	ND	X	1 pulmão	4cm	0m
TBT 113	35	F	SIM	X	1 pulmão	NÃO	6m
TBT 154	21	M	SIM	X	1 pulmão	>4cm	6m
TBT 155	22	M	SIM	X	1 pulmão	4cm	6m
TBT 156	21	M	SIM	X	1 pulmão	4cm	6m
TBT 157	72	M	SIM	X	1 pulmão	ND	6m
TBT 158	40	M	SIM	X	1 pulmão	SIM	6m
TBT 162	30	M	SIM	X	1 pulmão	4cm	6m
TBT 164	49	F	SIM	X	ND	ND	6m
TBT 171	45	M	NÃO	X	ND	SIM	6m
TBT 172	45	F	SIM	X	1 pulmão	ND	6m

ND – Não Disponível

Tabela 3 - Classificação da tuberculose pulmonar de acordo com a National Tuberculosis Association (1961).

CLASSIFICAÇÃO	LESÕES*	CAVIDADES*	ENVOLVIMENTO PULMONAR
Mínima	Lesões com densidade leve a moderada	Não apresenta cavidades visíveis	Envolve uma pequena parte do ápice de um ou ambos os pulmões
Moderada	Lesões disseminadas de densidade leve a moderada	Poucas cavidades com volume até 4 cm	Pode atingir um terço de um ou ambos os pulmões
Severa	Lesões disseminadas de densidade moderada	Cavidades disseminadas com volume maior do que 4 cm	Pode envolver grande parte de um ou ambos os pulmões

* aspecto na radiografia

Tabela 4 - Dados dos indivíduos controles, estudados quanto à produção de quimiocinas no plasma.

PACIENTES	IDADE	SEXO	VACINAÇÃO COM	
			BCG	PPD (mm)
CS 72	29	M	SIM	8mm
CS 77	44	M	SIM	0mm
CS 80	25	F	SIM	0mm
CS 81	33	F	SIM	0mm
CS 98	26	M	SIM	0mm
CS 104	23	F	SIM	0mm
CS 110	18	F	SIM	0mm
CS 118	23	F	SIM	0mm
CS 119	20	M	SIM	0mm
CS 123	21	F	SIM	ND
CS 124	22	F	SIM	1mm
CS 128	22	F	SIM	0mm
CS 129	21	M	SIM	5mm
CS 130	24	F	SIM	2mm
CS 131	25	F	SIM	ND
CS 132	23	F	SIM	0mm
CS 135	22	M	SIM	ND
CS 136	21	F	SIM	0mm
CS 138	21	F	SIM	0mm
CS 139	19	F	SIM	0mm
CS 142	20	F	ND	ND
CS 143	22	F	ND	ND
CS 145	21	F	SIM	8mm
CS 146	23	F	SIM	0mm
CS 147	22	M	ND	7mm
CS 149	22	F	SIM	4mm
CS 150	35	F	SIM	2mm
CS 151	25	M	SIM	4mm
CS 152	23	F	SIM	ND
CS 153	21	F	SIM	ND

ND – Não Disponível

Tabela 5 - Dados dos indivíduos controles e contatos, estudados quanto à produção de citocinas e quimiocinas em cultura.

INDIVÍDUOS	IDADE	SEXO	VACINAÇÃO	
			COM BCG	PPD (mm)
CS 98	23	M	ND	0mm
CS 133	22	M	SIM	12mm
CS 134	20	M	SIM	11mm
CS 118	23	F	SIM	0mm

CS 139	19	F	SIM	0mm
CS 140	21	F	SIM	10mm
CS 149	22	F	SIM	4mm
CS 150	35	F	SIM	2mm
CS 154	31	F	SIM	13mm
CS 157	23	F	SIM	12mm
CS 161	24	F	SIM	0mm
CS 162	25	M	SIM	0mm
CS 164	23	F	SIM	0mm
CT 95	26	F	SIM	ND
CT 87	36	F	SIM	ND
CT 94	18	F	SIM	ND
CT 144	40	F	SIM	ND
CT 163	23	F	ND	ND

ND – Não Disponível

3.2. COLETA DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Para coleta de sangue periférico de pacientes e controles foram utilizados tubos vacutainer com heparina. O volume de sangue coletado foi diluído 1:2 (vol/vol) em salina tamponada fosfatada (PBS) estéril, a separação do plasma e das PBMC dos demais componentes sanguíneos foi realizada por gradiente de densidade em Ficoll-Paque Plus (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden), através de centrifugação por 30 minutos, a 2000 rotações por minuto (rpm) e à temperatura ambiente. Em seguida os plasmas foram coletados e congelados em freezer -70 °C até o uso. A camada de PBMC também foi coletada e submetida a duas lavagens (1ª: 1800 rpm/4 °C/ 10 min.; 2ª: 1500 rpm/ 4 °C/ 10 min.) em PBS estéril e em seguida foi realizada a contagem em câmara de Neubauer. Durante o processo de contagem foi avaliada também a viabilidade das células através da coloração com Trypan blue (BDH Chemicals Ltd, England). Assim foram aliqüotadas 10^7 células/ml em uma solução de 90% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA) mais 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em criotubos de 1,8 ml (Nunc, Roskilde, Denmark), congeladas por um dia no freezer a - 70°C e preservadas em nitrogênio líquido até o momento de realização das culturas.

3.3 EXTRAÇÃO DE QUIMIOCINAS NO PLASMA HUMANO

Os plasmas congelados em freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongelados e processados para correta avaliação dos níveis de quimiocinas no plasma. De acordo com Rot e Andrian (2004), açúcares sulfatados de glicosaminoglicanas (GAG) podem se ligar as quimiocinas, dificultando a mensuração dessas proteínas no plasma. Desse modo as amostras de plasma foram submetidas à extração de quimiocinas ligadas aos GAGs. As amostras de plasma foram diluídas (1:2) na solução de processamento contendo ácido trifluoroacético 1,2% e cloreto de sódio 1,35M, em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm por cinco minutos à 4° C . Os sobrenadantes dessas amostras foram coletados e diluídos (1:4) na solução de Neutralizing Mix (0,5 ml de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1M pH 7,4 + 0,45ml NaOH 1M + 0,05ml de Phenol Red + 50ml de H_2O), posteriormente foram adicionados em cada amostra 10 μl de BSA 10% e finalmente o pH das amostras foi ajustado para 7,4. As amostras foram então congeladas a -20° C .

3.4 CULTURA DE PBMC ESTIMULADAS COM ANTÍGENOS DO *Mycobacterium. tuberculosis*

As células criopreservadas foram descongeladas, lavadas em meio de cultura e ajustadas para uma concentração de 10^6 células/ml em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA). 200 μl das células foram cultivadas (2×10^5 células /poço) em placas de 96 poços (Millipore, Bedford, MA, USA) em meio RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 10 $\mu\text{l/ml}$ de aminoácidos não essenciais (todos adquiridos de Gibco, Grand Island, NY, USA) e 10% de plasma humano AB (Hemominas, Juiz de Fora, MG) inativado pelo calor. Os antígenos recombinantes foram doados pelo Dr. Tom H. E. Ottenhoff, da Leiden University Medical Center, Holanda, colaborador neste estudo. Os estímulos para essas culturas foram realizados através dos antígenos recombinantes do *M. tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 (5 $\mu\text{g/ml}$) e 16-kDa (5 $\mu\text{g/ml}$). As culturas de células foram mantidas à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa com 5% de CO_2 por 4 dias para detecção das

quimiocinas e citocinas. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados em freezer -20 °C.

3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE CBA

Foi utilizada a técnica de CBA a fim de se determinar a concentração das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 (nos sobrenadantes de culturas de PBMC) e das quimiocinas IL-8, IP-10, MCP-1, MIG e RANTES (nos sobrenadantes de culturas de PBMC e nos plasmas sangüíneos)

3.5.1 MÉTODO DE CBA

Para análise da produção de citocinas e quimiocinas, os sobrenadantes de cultura e plasmas sangüíneos foram descongelados em banho-maria à 37° C e centrifugados por 10 minutos a 3700 rpm. Foram utilizados 5 μ l dessas amostras para quantificação da produção de quimiocinas. Todos os reagentes usados nesta etapa foram provenientes dos kits (“Human chemokine – kit I” e “Human Th1/Th2 cytokine kit II”) adquiridos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). Em cada tubo com essas alíquotas foram adicionados 20 μ l de diluente G. Posteriormente as amostras receberam 3 μ l de cada reagente, para marcar a produção de cada quimiocina (IL-8, IP-10, MCP-1, MIG e RANTES) e citocina (IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-4), e em seguida foram lavadas com 500 μ l de reagente F e centrifugadas a 1300 rpm durante 7 minutos. Em cada tubo os sobrenadantes provenientes dessa centrifugação foram aspirados com bomba de vácuo, restando aproximadamente 100 μ l de amostras marcadas. Foram adicionados 18 μ l de revelador (reagente B) em cada amostra, para incubação à temperatura ambiente por 1:30h. Após esse período, as amostras foram novamente lavadas, centrifugadas e aspiradas nas mesmas condições citadas acima. Em cada tubo foram colocados

100µl de reagente F para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura de padrões e amostras, os dados foram analisados no software BD CBA Isotype Analysis (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram representados em concentração (pg/ml) de cada quimiocina e citocina.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise de normalidade dos dados foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os grupos de dados paramétricos foram comparados através dos testes "t de Student" e ANOVA, sendo usado em seguida o teste de Tukey. Para os dados não paramétricos e não pareados foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, sendo realizado posteriormente o teste de Dunn. Para análise dos dados não paramétricos e pareados foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão (EP). Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística significativa entre os grupos estudados. A resposta positiva no estudo com os antígenos foi mostrada pela produção das citocinas e quimiocinas estimuladas menos a produção das amostras não estimuladas. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DOS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS NO PLASMA HUMANO

4.1.1 DETECÇÃO DAS QUIMIOCINAS MIG, IP-10 E IL-8 NO PLASMA DE INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES COM TUBERCULOSE

Os níveis de quimiocinas no plasma sanguíneo foram obtidos pelo método de CBA, após o processamento das amostras a fim de se extrair as quimiocinas ligadas aos GAGs, e permitir uma real mensuração dos níveis dessas moléculas no plasma de indivíduos controles sadios vacinados com BCG (CS) e de pacientes com TB ativa não tratada (TBA), pacientes com TB sob tratamento (TBST) e de pacientes tratados (TBT).

As quimiocinas MIG, IP-10 e IL-8 mostraram-se elevadas nos pacientes com TB ativa, quando comparadas aos demais grupos (Fig. 2). A quantidade dessas quimiocinas produzidas pelos indivíduos do grupo controle foi significativamente menor quando comparadas ao grupo de pacientes com TB ativa, os quais ainda não haviam recebido tratamento. Foi possível observar um perfil de resposta imunológica marcante de MIG, IP-10 e IL-8 ao se iniciar o tratamento, visto que os seus níveis diminuíram significativamente em relação aos pacientes não tratados, e chegando ao final do tratamento a níveis próximos dos grupos controles. Na Tabela 6 podemos visualizar as médias das concentrações de MIG, IP-10, e IL-8 no plasma.

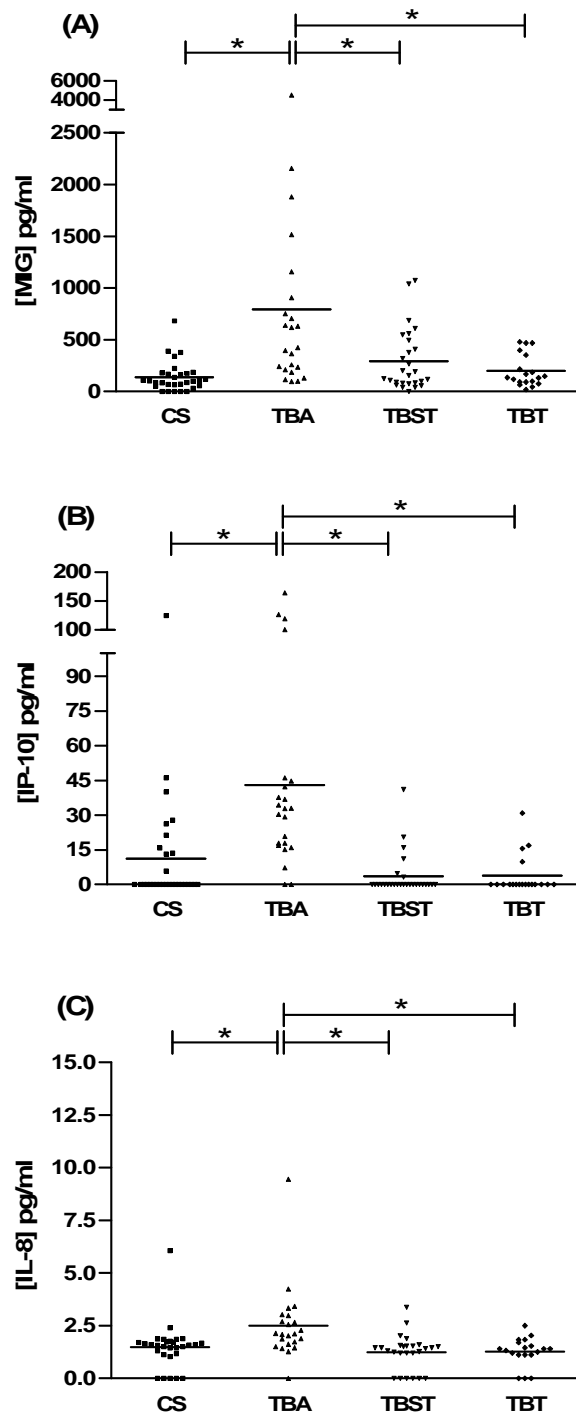


Figura 2 - Concentração das quimiocinas MIG (A), IP-10 (B) e IL-8 (C) no plasma de indivíduos controles sadios (CS) e pacientes com TB ativa (TBA), sob tratamento (TBST) e pacientes tratados (TBT), determinada por CBA. As barras horizontais inferiores representam as médias de cada grupo.

* $p < 0,05$.

Tabela 6 - Concentração média de quimiocinas no plasma de indivíduos controles sadios (CS), de pacientes com TB ativa (TBA), de pacientes sob tratamento (TBST) e de tratados (TBT).

Grupos	MIG (pg/ml) ^(a)	IP-10 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
CS	138,77 ^(*) ± 32,72	11,16 ^(*) ± 4,57	1,49 ^(*) ± 0,20
TBA	793,81 ± 206,93	43,02 ± 8,92	2,52 ± 0,36
TBST	293,3 ^(*) ± 57,02	3,58 ^(*) ± 1,76	1,25 ^(*) ± 0,16
TBT	197,7 ^(*) ± 35,45	3,85 ^(*) ± 1,94	1,28 ^(*) ± 0,15

^(a) Média ± EP. ^(*) $p < 0,05$ versus TBA.

4.1.2 DETECÇÃO DE MCP-1 E RANTES NO PLASMA DE INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES COM TUBERCULOSE

Em contraste com as outras quimiocinas estudadas os níveis de MCP-1 e RANTES nos pacientes com TB ativa não diferenciaram dos indivíduos controles, apresentando-se similares a estes (Fig. 3; Tabela 7). Após o início do tratamento também houve uma diminuição nos níveis dessas quimiocinas. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos quanto à produção de MCP-1, nos pacientes com TB sob tratamento e nos tratados, os níveis dessa quimiocina diminuíram em comparação com os níveis encontrados nos grupos de controles sadios e de pacientes com TB ativa (Fig. 3A; Tabela 7). RANTES mostrou este perfil de diminuição significativa nos grupos sob tratamento (TBST) e tratados (TBT) quando comparado ao grupo controle. Ocorreu ainda diminuição significativa quando comparados os grupos TBST e TBT com o grupo de pacientes não-tratados. (Fig. 3B; Tabela 7).

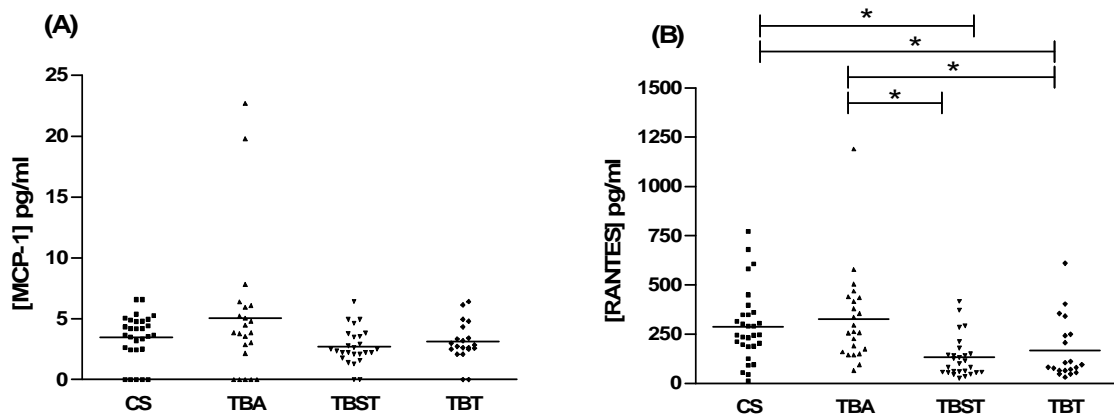


Figura 3 - Concentração das quimiocinas MCP-1 (A) e RANTES (B) no plasma de indivíduos controles sadios (CS) e pacientes com TB ativa (TBA), sob tratamento (TBST) e pacientes tratados (TBT), determinada por CBA (Cytometric Bead Array). As barras horizontais inferiores representam as médias de cada grupo. * $p < 0,05$.

Tabela 7 - Concentração das quimiocinas MCP-1 e RANTES no plasma de indivíduos controles sadios (CS), de pacientes com TB ativa (TBA), de pacientes sob tratamento (TBST) e de tratados (TBT).

Grupos	MCP-1 (pg/ml) ^(a)	RANTES (pg/ml)
CS	3,47 ± 0,36	289,14 ± 33,42 ^(*)
TBA	5,08 ± 1,20	327,66 ± 48,89 ^(*)
TBST	2,72 ± 0,29	131,7 ± 19,81
TBT	3,12 ± 0,37	167,57 ± 34,70

^(a) Média ± EP. ^(*) $p < 0,05$ versus TBST e TBT.

4.1.3 NÍVEIS DE QUIMIOCINAS NO PLASMA DE PACIENTES ANTES E APÓS O TRATAMENTO E DURANTE OS MESES DE TRATAMENTO ANTI-TUBERCULOSE

Dentro da população estudada, os níveis de quimiocinas no plasma foram dosados em onze pacientes antes de iniciarem o tratamento anti-TB e dosados novamente após estes mesmos completarem os seis meses de tratamento. Como observado nos resultados anteriormente mostrados, os níveis de MIG, IP-10, IL-8 e RANTES diminuíram significativamente na maioria dos pacientes após o tratamento

anti-TB. Somente os níveis de MCP-1 não mostraram diminuição significativa após o tratamento nesses pacientes (Fig. 4).

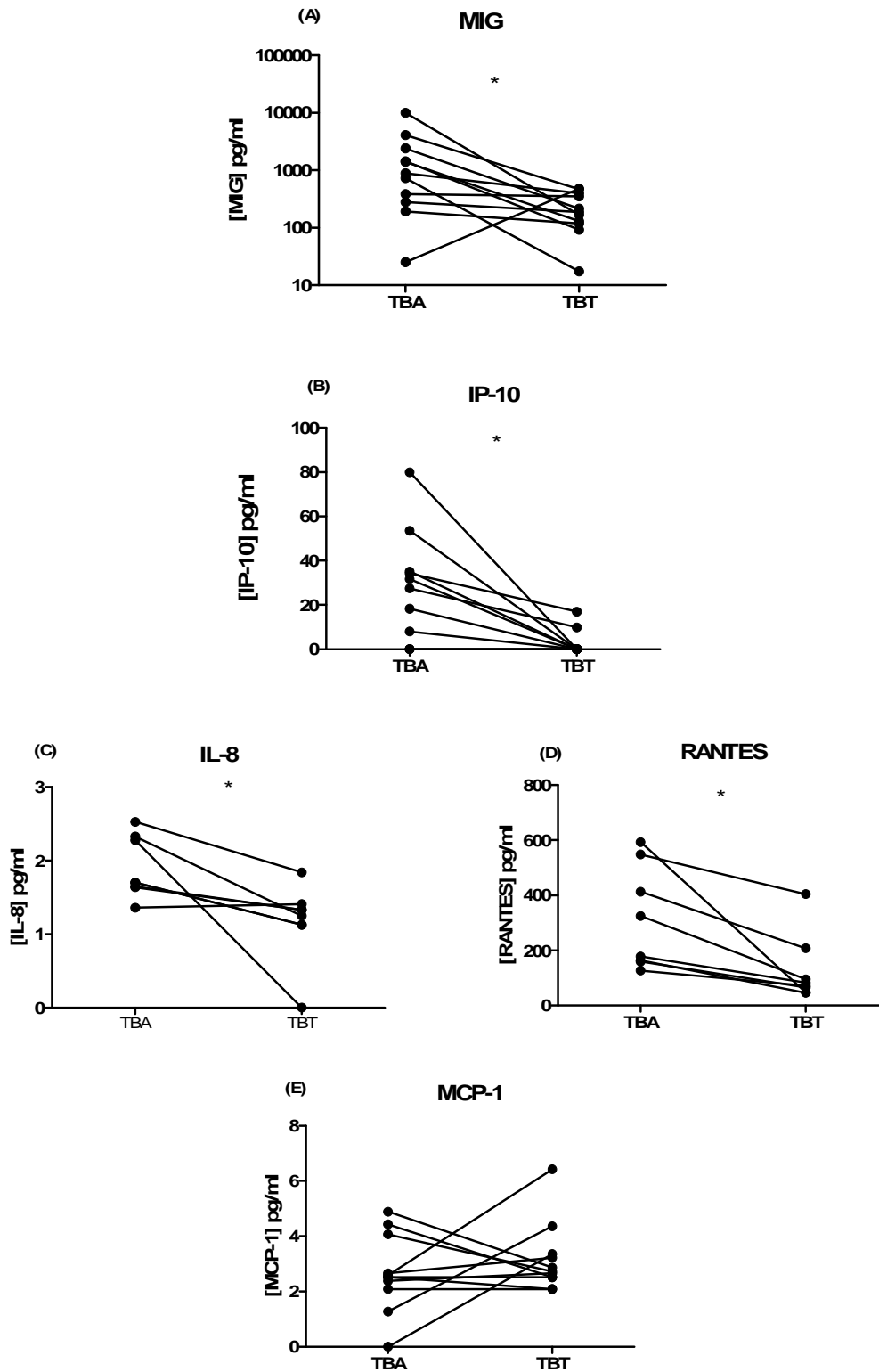


Figura 4 - Níveis de quimiocinas no plasma dos mesmos pacientes, dosados antes (TBA) e após o tratamento (TBT); n=11 para (A) MIG, (B) IP-10 e (E) MCP-1; n=8 para (C) IL-8 e (D) RANTES. * $p < 0,05$.

O grupo de pacientes sob tratamento (TBST) foi composto por cinco subgrupos, um para cada mês de tratamento. Os níveis de quimiocinas no plasma de indivíduos sob tratamento foram semelhantes levando em consideração cada mês separadamente. As médias \pm erro padrão da concentração de quimiocinas no plasma dos pacientes sob tratamento estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações médias de quimiocinas durante cada mês de tratamento no grupo de pacientes com TB sob tratamento (TBST).

Meses de tratamento	Porcentagem de indivíduos em tratamento (total n = 27) ^(a)	MIG (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	RANTES (pg/ml)
1 mês	33% (n=9)	341,95 \pm 108,44	4,03 \pm 2,29 ^(b)	1,48 \pm 0,08	2,65 \pm 0,44	120,12 \pm 27,95
2 meses	22% (n=6)	452,59 \pm 180,18	9,52 \pm 7,48	1,67 \pm 0,53	4,00 \pm 1,71	180,36 \pm 65,00
3 meses	15% (n=4)	164,62 \pm 78,93	0,79 \pm 0,79	0,36 \pm 0,36	1,89 \pm 0,76	139,94 \pm 77,62
4 meses	15% (n=4)	208,17 \pm 79,95	0,00 \pm 0,00	4,45 \pm 2,23	3,13 \pm 1,10	102,47 \pm 26,58
5 meses	15% (n=4)	158,54 \pm 54,32	0,00 \pm 0,00	1,14 \pm 0,38	3,60 \pm 0,71	105,09 \pm 19,4

^(a) Porcentagem de indivíduos em cada mês de tratamento dentro do grupo de pacientes sob tratamento (TBST); ^(b) Média \pm EP.

4.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS POR PBMC APÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS DO *Mycobacterium tuberculosis*

4.2.1 PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PBMC HUMANAS

Através do método de CBA as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 foram avaliadas no sobrenadante de cultura de PBMC humanas após estímulo com os antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa.

O antígeno ESAT-6/CFP-10 foi capaz de estimular uma maior produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6 principalmente pelos pacientes com TB ativa (TBA) em comparação com os demais grupos (Fig. 5 e Tabela 9), principalmente quando comparados aos indivíduos do grupo controle sadio (CS) ($p < 0,05$). O grupo de indivíduos que tiveram contato com pacientes TB (CT) quando estimulados com ESAT-6/CFP-10 também apresentaram maiores níveis de produção de IFN- γ ($p <$

0,05), IL-2 ($p < 0,05$) e IL-6 em relação aos grupos de indivíduos controles sadios (CS) e de pacientes tratados (TBT). Os grupos CS e TBT tiveram níveis próximos de produção dessas citocinas, observado principalmente quanto à produção de IFN- γ , e IL-6, após estímulo com o antígeno ESAT-6/CFP-10.

Após estímulo com o antígeno 16kDa (Fig. 5 e Tabela 9) os grupos estudados não diferenciaram entre si quanto à produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2.

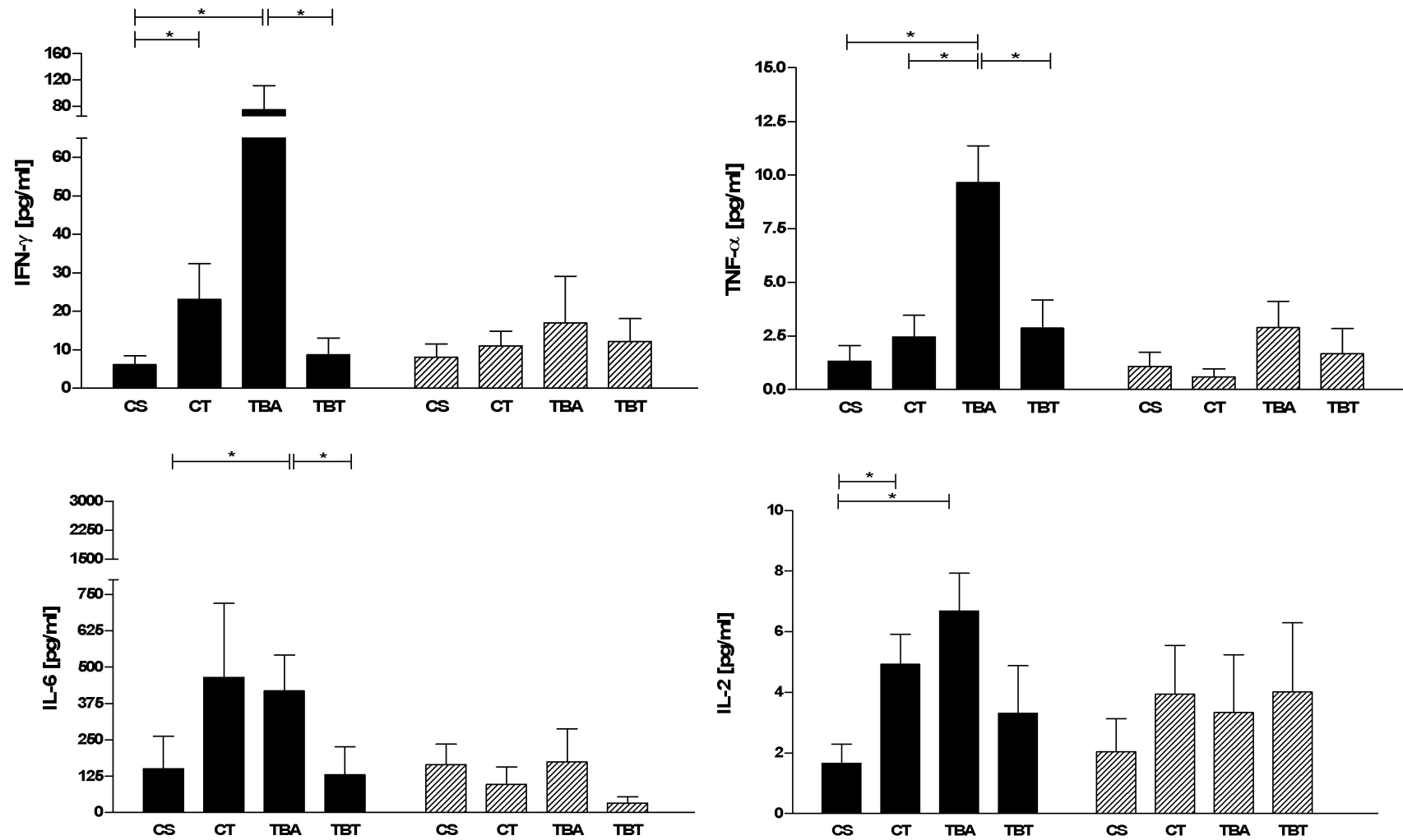


Figura 5 - Produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 (barras em preto) e 16kDa (barras achuradas), dosadas nos indivíduos controles sadios (CS), nos indivíduos contatos (CT), nos pacientes com TB ativa (TBA) e nos pacientes tratados (TBT); * $p < 0,05$.

Tabela 9 - Produção média de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 por PBMC em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa, nos grupos de indivíduos controles sadios (CS), de indivíduos contatos de pacientes TB (CT), de pacientes com TB ativa (TBA) e de pacientes tratados (TBT).

Grupos (Estímulo)	IFN- γ (pg/ml) ^(a)	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
CS (ESAT-6/CFP-10)	6,09 ^(*) (\bullet) \pm 2,31	1,34 ^(*) \pm 0,72	151,0 ^(*) \pm 111,1	1,66 ^(*) (\bullet) \pm 0,64
CT (ESAT-6/CFP-10)	23,10 \pm 9,28	2,46 ^(*) \pm 1,00	464,5 \pm 254,5	4,92 \pm 1,00
TBA (ESAT-6/CFP-10)	74,37 \pm 37,13	9,66 \pm 1,72	417,9 \pm 123,0	6,69 \pm 1,24
TBT (ESAT-6/CFP-10)	8,64 ^(*) \pm 4,43	2,86 ^(*) \pm 1,31	130,1 ^(*) \pm 95,57	3,31 \pm 1,57
CS (16kDa)	5,51 \pm 2,52	1,09 \pm 0,66	164,1 \pm 70,44	2,04 \pm 1,09
CT (16kDa)	11,0 \pm 3,80	0,60 \pm 0,36	97,32 \pm 59,60	3,94 \pm 1,61
TBA (16kDa)	16,96 \pm 12,14	2,89 \pm 1,23	278,7 \pm 170,7	3,33 \pm 1,91
TBT (16kDa)	12,16 \pm 5,80	1,67 \pm 1,17	32,12 \pm 21,41	4,01 \pm 2,29

^(a) Média \pm EP. ^(*) $p < 0,05$ versus TBA; ^(\bullet) versus CT.

A produção de IL-10 ($p < 0,05$) e IL-4 foi elevada nos grupos de indivíduos controles e contatos (CS e/ou CT) em relação aos pacientes TB (TBA e TBT) sob ambos os estímulos (ESAT-6/CFP-10 e 16kDa) (Fig. 6 e Tabela 10).

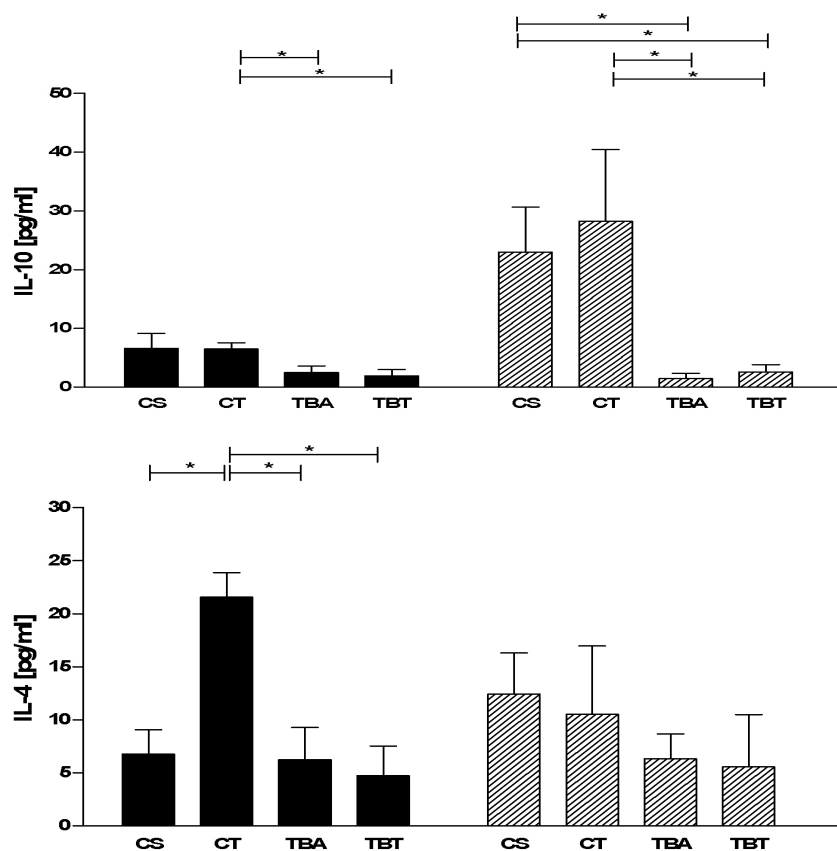


Figura 6 - Produção das citocinas IL-10 e IL-4 por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 (barras em preto) e 16kDa (barras achuradas), dosadas nos indivíduos controles sadios (CS), nos indivíduos contatos (CT), nos pacientes com TB ativa (TBA) e nos pacientes tratados (TBT), * $p < 0,05$.

Tabela 10 - Produção média de IL-10 e IL-4 por PBMC em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa, nos grupos de indivíduos controles sadios (CS), de indivíduos contatos de pacientes TB (CT), de pacientes com TB ativa (TBA) e de pacientes tratados (TBT).

Grupos (Estímulo)	IL-10 (pg/ml) ^(a)	IL-4 (pg/ml)
CS (ESAT-6/CFP-10)	6,58 ± 2,55	6,79 ± 2,29 ^(•)
CT (ESAT-6/CFP-10)	6,05 ± 1,28	21,56 ± 2,33
TBA (ESAT-6/CFP-10)	2,46 ± 1,14 ^(•)	6,24 ± 3,03 ^(•)
TBT (ESAT-6/CFP-10)	1,92 ± 1,10 ^(•)	4,74 ± 2,79 ^(•)
CS (16kDa)	22,98 ± 7,67	9,91 ± 3,16
CT (16kDa)	28,24 ± 12,17	10,35 ± 6,44
TBA (16kDa)	1,46 ± 0,88 ^{(•)(▽)}	6,33 ± 2,35
TBT (16kDa)	2,57 ± 1,25 ^{(•)(▽)}	5,57 ± 4,93

^(a) Média ± EP. $p < 0,05$ ^(•) versus CT; ^(▽) versus CS.

4.2.2 PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS POR PBMC HUMANAS

A produção das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8, RANTES e MCP-1 por PBMC humanas em cultura após estímulo com os antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa também foi avaliada pelo método de CBA.

As quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES (Fig. 7 e Tabela 11) mostraram-se elevadas no grupo dos pacientes com TB ativa (TBA) em relação aos demais grupos, principalmente quando comparadas aos grupos CS ($p < 0,05$) e TBT ($p < 0,05$), após estímulo com ESAT-6/CFP-10. Os níveis de MIG ($p < 0,05$), IP-10, IL-8 ($p < 0,05$) e RANTES ($p < 0,05$) no grupo de indivíduos contatos (CT) também foram elevados em relação aos grupos CS e TBT sob estímulo do antígeno ESAT-6/CFP-10. Já a quimiocina MCP-1 (Fig. 8 e Tabela 11) nos grupos de pacientes TB (TBA e TBT) foi encontrada em baixos níveis em relação ao grupo dos indivíduos controles (CS: $p < 0,05$) após estímulo com ESAT-6/CFP-10.

O antígeno 16kDa (Fig. 7 e Tabela 11) estimulou níveis próximos de MIG e IP-10 em todos os grupos estudados, além dessas quimiocinas os níveis de IL-8 e RANTES também não diferenciaram estatisticamente entre os grupos. Os níveis de MCP-1 ($p < 0,05$) (Fig. 8 e Tabela 11), quando as PBMC foram estimuladas com 16kDa, mostraram-se elevados nos grupos CS e CT em relação aos grupos de pacientes TB (TBA e TBT).

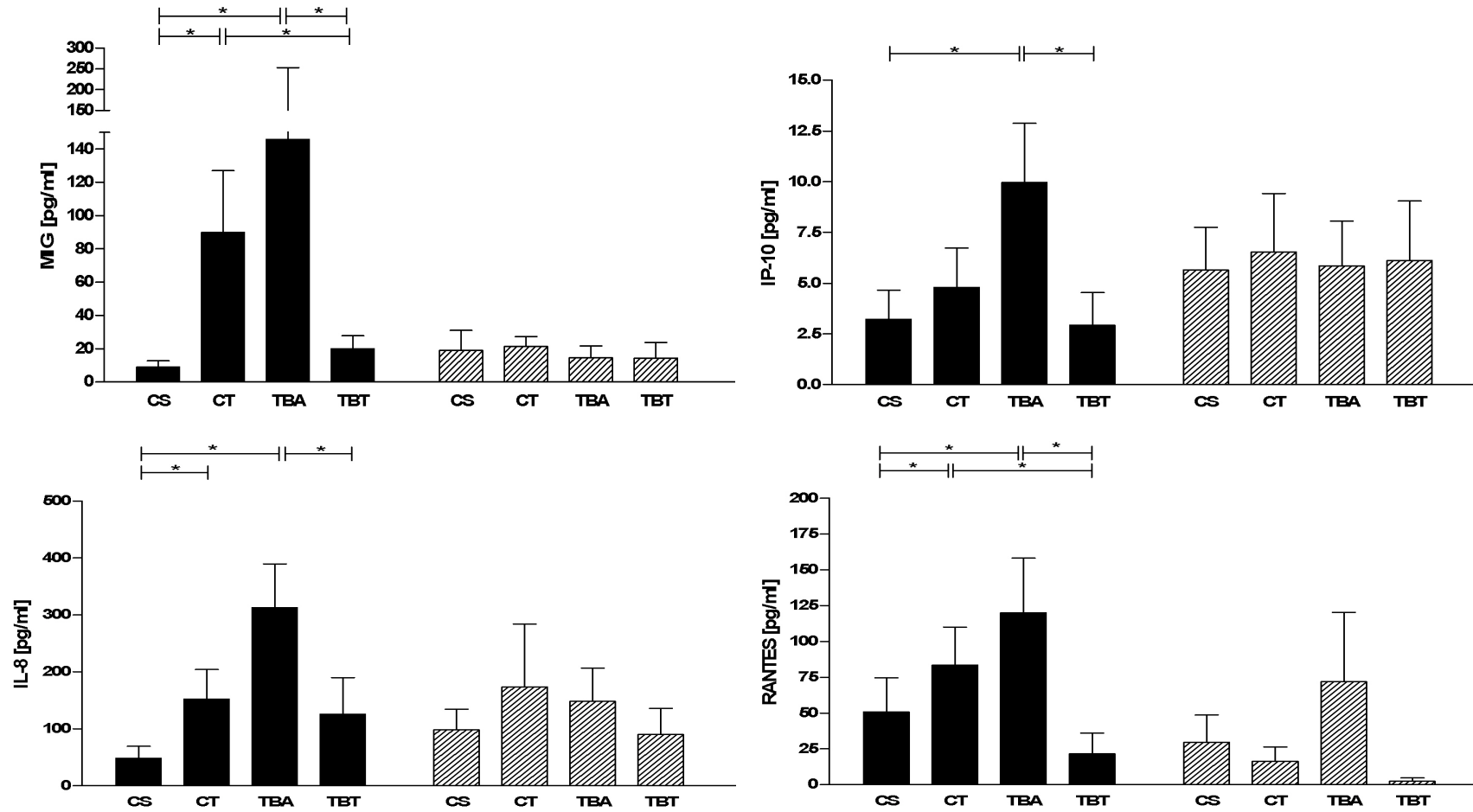


Figura 7 - Produção das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 (barras em preto) e 16kDa (barras achuradas), dosadas nos indivíduos controles sadios(CS), nos indivíduos contatos (CT), nos pacientes com TB ativa (TBA) e nos pacientes tratados (TBT). * $p < 0,05$.

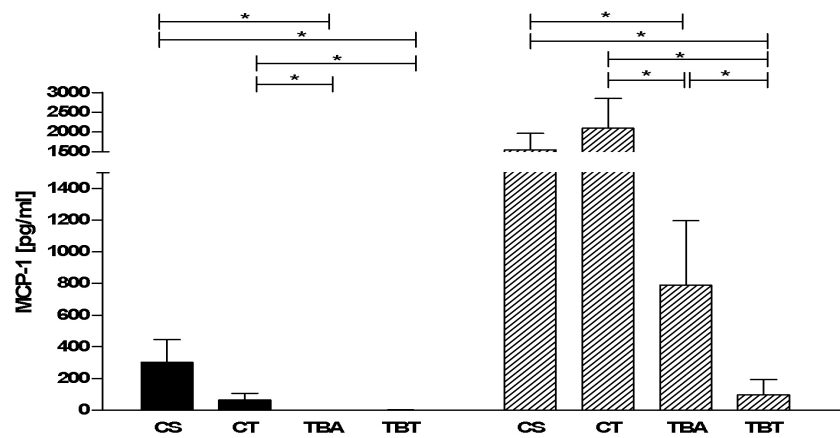


Figura 8 - Produção de MCP-1 por PBMC humanas em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 (barras em preto) e 16kDa (barras achuradas), dosadas nos indivíduos controles sadios(CS), nos indivíduos contatos (CT), nos pacientes com TB ativa (TBA) e nos pacientes tratados (TBT). * $p < 0,05$.

Tabela 11 - Produção média de quimiocinas por PBMC em cultura sob estímulo dos antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa, nos grupos de indivíduos controles sadios (CS), de indivíduos contatos de pacientes TB (CT), de pacientes com TB ativa (TBA) e de pacientes tratados (TBT).

Grupos (Estímulo)	MIG (pg/ml) ^(a)	IP-10 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	RANTES (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
CS (ESAT-6/CFP-10)	8,87 ^(*) (●) ± 3,08	3,22 ^(*) ± 1,44	71,1 ^(*) (●) ± 30,1	50,7 ^(*) (●) ± 24,01	300,8 ± 145,1
CT (ESAT-6/CFP-10)	89,9 ± 37,13	4,28 ± 2,14	152,5 ± 51,72	83,39 ± 26,56	64,05 ± 42,11
TBA (ESAT-6/CFP-10)	145,8 ± 106,9	9,97 ± 2,91	362,5 ± 75,76	119,9 ± 38,3	0,0 ^(●) (↖) ± 0,0
TBT (ESAT-6/CFP-10)	19,94 ^(*) (●) ± 7,89	2,93 ^(*) ± 1,61	129,3 ^(*) ± 63,4	21,54 ^(*) (●) ± 14,58	0,91 ^(●) (↖) ± 0,91
CS (16kDa)	18,92 ± 12,11	5,65 ± 2,1	72,79 ± 31,59	29,63 ± 19,00	1547,0 ± 420,5
CT (16kDa)	21,28 ± 6,08	6,54 ± 2,89	174,0 ± 109,8	16,38 ± 10,03	2097,0 ± 745,6
TBA (16kDa)	14,33 ± 7,15	5,85 ± 2,22	309,2 ± 168,9	71,84 ± 48,34	789,5 ^(●) (↖) ± 406,2
TBT (16kDa)	14,45 ± 9,45	6,12 ± 2,95	167,7 ± 87,72	2,38 ± 2,38	96,92 ^(●) (↖) ± 96,9

^(a) Média ± EP. ^(*) $p < 0,05$ versus TBA; ^(●) versus CT; ^(↖) versus CS.

5 DISCUSSÃO

5.1 QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS NA TUBERCULOSE

5.1.1 NÍVEIS DE MIG, IP-10 E IL-8 NO PLASMA HUMANO SE APRESENTARAM AUMENTADOS NOS PACIENTES COM TUBERCULOSE ATIVA

Devido à complexa resposta imunológica desencadeada pelo *M. tuberculosis*, há necessidade de estudos que auxiliem no entendimento da dinâmica da resposta imunológica contra TB. Existem vários trabalhos visando conhecer a expressão de quimiocinas em resposta ao *M. tuberculosis in vitro* e *in vivo*, em humanos e em camundongos (LIN et al., 1998; SADEK et al., 1998; CHIU et al., 2002; SEILER et al., 2003; OKAMOTO et al., 2005; ALGOOD, LIN e FLYNN, 2005; BADEWA et al., 2005; ABRAMO et al., 2006). Porém, devido à complexidade do sistema de migração de células para o tecido em resposta a infecção e à redundância do sistema de quimiocinas, torna-se difícil avaliar a contribuição individual de cada proteína (CREVEL et al., 2002).

M. tuberculosis é um forte indutor da expressão de quimiocinas (ALGOOD, CHAN e FLYNN, 2003). O granuloma presente na resposta imunológica contra *M. tuberculosis*, pode ser formado por macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Os principais mediadores do recrutamento dessas células para o local da infecção, e formação do granuloma, são as quimiocinas MIG, IP-10 e IL-8 são quimiocinas pró-inflamatórias, as quais participam efetivamente deste processo. A citocina IFN- γ induz monócitos/macrófagos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos a produzirem MIG e IP-10 (SEILER et al., 2003). Essas quimiocinas atraem principalmente células T ativadas para o local da infecção.

No presente trabalho foram observados níveis elevados de MIG e IP-10 nos pacientes com TB pulmonar ativa não tratada em relação aos demais grupos (CS, TBST e TBT). Nossos achados estão de acordo com outros trabalhos, como visto nos estudos de Azurri et al (2005), no qual foram encontrados níveis elevados de IP-10 no plasma de pacientes com TB ativa quando comparados aos indivíduos

controles. Juffermans et al (1999) mostraram altos níveis de IP-10 no soro de pacientes com TB em relação ao soro de contatos sadios ou indivíduos controles. Em estudos de Sauty et al (1999) foi visto que células epiteliais brônquicas podem induzir a expressão de altos níveis de RNAm de MIG e IP-10, também foi demonstrado que células epiteliais brônquicas e células recolhidas do lavado bronco-alveolar de pacientes com TB pulmonar ativa produzem grande quantidade de IP-10. Abramo et al (2006) mostrou que MIG pode ser um potente biomarcador para acessar a resposta inicial induzida por IFN- γ na TB.

Além disso, nossos resultados mostram que os níveis das quimiocinas IP-10, MIG e IL-8 diminuíram com o tratamento. Azurri et al. (2005) também observaram diminuição de IP-10 após dois meses de tratamento. IP-10 e MIG, embora tenham sido detectados no plasma, atuam na imunidade celular local, deste modo estão envolvidos na quimiotaxia de linfócitos T ativados, amplificando a resposta de células Th1 no sítio da infecção por *M. tuberculosis* (OKAMOTO et al., 2005). Alessandri et al. (2006) também relataram níveis plasmáticos de MIG e IL-8 elevados em pacientes com TB pulmonar ativa em relação aos indivíduos controles, e foi notado diminuição dessas quimiocinas no plasma após o tratamento contra TB. Porém, estes mesmos autores não observaram diferença significativa nos níveis plasmáticos de IP-10, em relação aos grupos citados anteriormente.

Lin et al. (1998) mostraram uma elevada expressão de RNAm para IL-8 em células do epitélio alveolar humano da linhagem A549, após 6 dias de infecção com *M. tuberculosis*. Assim como as quimiocinas MIG e IP-10, foi detectada uma diferença significativa nos níveis de IL-8, os quais estavam elevados no plasma de pacientes com TB ativa em relação aos demais grupos. Hasan et al. (2005) também observaram IL-8 no soro de pacientes com TB pulmonar ativa em quantidades significativamente mais altas em comparação aos indivíduos controles. Os níveis de IL-8 também diminuíram significativamente com o início do tratamento. Ribeiro-Rodrigues et al. (2002) mostraram, através da análise de quimiocinas no escarro de pacientes com TB, diminuição na produção de IL-8 já na segunda semana de tratamento, correlacionando com a diminuição do número de bacilos no escarro após cultura. Ainda assim, Kurashima et al. (1997) constataram diminuição da quantidade de IL-8 no lavado broncoalveolar de pacientes com doença ativa após o início do tratamento. Hoheisel et al. (1998) não conseguiram detectar IL-8 no soro de pacientes com TB pleural ativa, porém encontraram elevada quantidade da

quimiocina no líquido pleural desses pacientes, sugerindo uma produção local dessa quimiocina no sítio da doença. Tal fato pode explicar os baixos níveis de IL-8 encontrados no plasma dos grupos estudados quando comparados aos níveis de MIG e IP-10.

5.1.2 NÍVEIS DE MCP-1 E RANTES NO PLASMA HUMANO NÃO DIFERENCIAM ENTRE INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES COM TUBERCULOSE ATIVA

Segundo Raja (2004) MCP-1 é uma quimiocina produzida por macrófagos alveolares humanos na infecção *in vitro* com *M. tuberculosis*. MCP-1 é produzida por e ao mesmo tempo atuante em monócitos e macrófagos (CREVEL et al., 2002). *M. tuberculosis* induz preferencialmente a produção de MCP-1 por monócitos (KASAHARA et al., 1994).

Embora Juffermans, et al. (1999) tenham mostrado níveis mais altos de MCP-1 no soro de pacientes com TB ativa em relação aos controles PPD negativos (de área não endêmica de TB), nossos dados revelaram apenas um discreto aumento de MCP-1 no grupo de pacientes com TB ativa (TBA) em relação aos indivíduos controles sadios. O nível desta quimiocina não foi significativamente maior no grupo TBA quando comparado aos grupos TBST e TBT. Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos, nos quais os níveis de MCP-1 no soro ou no plasma de pacientes com TB ativa não diferenciaram em relação aos indivíduos controles sadios (KWIATKOWSKA, ZIEBA e KUZMINSKA, 1999; LEE et al., 2003; ALESSANDRI et al., 2006). Sadek et al. (1998) mostraram níveis elevados de MCP-1 no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares humanos infectados com *M. tuberculosis* H37Ra, porém foram encontrados baixos níveis de MCP-1 nas culturas de monócitos humanos infectados com esta cepa. Em conjunto estes achados sugerem que níveis de MCP-1 podem estar elevados no local da infecção por *M. tuberculosis*, mas são detectados níveis inferiores dessa quimiocina ao nível sistêmico.

Gu et al. (1997) mostraram que em camundongos transgênicos onde a expressão gênica de MCP-1 é controlada pelo MMTV-LRT (mouse mammary tumor vírus long terminal repeat), altos níveis dessa quimiocina correlacionaram com a

maior susceptibilidade à infecção por patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* e *M. tuberculosis*. Rutledge et al. (1995) observou, em uma linhagem semelhante de camundongos transgênicos resistentes à infecção por *L. monocytogenes*, baixos níveis de MCP-1 no soro. De acordo com esses resultados poderíamos supor que os baixos níveis de MCP-1, nos pacientes com TB ativa estudados, refletiriam a gravidade da infecção, ou seja, o fato desses pacientes apresentarem TB moderada.

RANTES é produzida por uma variedade de células e pode-se ligar a um grande número de receptores de quimiocinas (CREVEL et al., 2002). Em pacientes com TB, RANTES foi detectada no lavado broncoalveolar (KURASHIMA, 1997).

A quimiocina RANTES é produzida por várias células, incluindo células T e macrófagos, e induz migração de células T de memória, assim como monócitos e macrófagos, dois principais tipos celulares vistos no granuloma (CAMPBELLI et al., 1997). Saukkonen et al. (2002) demonstrou que RANTES compõe um grupo de quimiocinas que desempenham a função de inibir o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* em macrófagos alveolares de indivíduos infectados com HIV. *M. bovis* foi capaz de induzir a secreção de RANTES mediada por CD40 e dependente de fluxo de cálcio intracelular (MENDEZ-SAMPERIO, 2003). Porém, nossos dados demonstraram que os níveis de RANTES não diferenciaram entre os grupos controles e os pacientes com TB ativa. No trabalho de Sadek et al (1998) foi observado que os níveis de RNAm para RANTES foi fracamente regulado por *M. tuberculosis* em fagócitos mononucleares. O nível de RNAm para RANTES em células do baço e macrófagos de cobaias aumenta após a vacinação com BCG (JEEVAN et al., 2002; MCMURRAY et al., 2005). Esses dados podem explicar porque os níveis de RANTES estavam elevados nos grupos controles em nosso trabalho, pois todos esses indivíduos foram vacinados com BCG. Nossos dados também estão de acordo com os achados de Raja (2004), onde os níveis de RANTES e MCP-1 diminuem com o tratamento. Calleja et al. (1998) sugeriram que rifampicina ativa o receptor humano de glucocorticóide (hGR - human glucocorticoid receptor), conseqüentemente este antibiótico pode atuar como imunossupressor. Logo, a diminuição dos níveis de RANTES e MCP-1 nos pacientes após o início do tratamento, poderia estar sendo influenciada pela ação do tratamento quimioterápico anti-TB. Em contraste Jaffuel et al. (1999) mostrou que a rifampicina não ativou o receptor de glucocorticóide na linhagem células alveolares A549 e esse antibiótico

foi incapaz de inibir a expressão de um gene endógeno que contém elementos ativadores do fator nuclear NF- κ B, o qual participa da produção de quimiocinas como RANTES.

Achados sobre a formação do granuloma em camundongos indicam que RANTES é importante em promover a resposta por células Th1, enquanto MCP-1 pode estar envolvido na resposta Th2 (CHENSUE et al., 1999; KARPUS e KENNEDY. 1997; KARPUS et al., 1997). Tal fato poderia explicar os baixos níveis de MCP-1 e os níveis elevados de RANTES encontrados neste estudo. Olleros et al. (2005) mostraram que a susceptibilidade à infecção por BCG de camundongos TNF/linfotóxina-alfa (-/-), poderia estar relacionada à deficiente indução sistêmica de RANTES, a uma deficiente resposta imunológica sistêmica de células Th1, e a uma redução na atividade enzimática da óxido nítrico sintase, porém os níveis de MCP-1 não estavam reduzidos neste caso.

5.2 CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS APÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS DO *Mycobacterium tuberculosis*

5.2.1 RESPOSTA AO ANTÍGENO ESAT-6/CFP-10 EM PACIENTES COM TUBERCULOSE ATIVA LEVOU À PRODUÇÃO DE IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2

A infecção por *M. tuberculosis* resulta na indução de um grande número de citocinas, e o conjunto dessas mostram ser essenciais para o controle da doença, enquanto outras podem ter efeitos danosos ao hospedeiro, contribuindo para a patologia da TB (FLYNN, 2004).

No presente trabalho os níveis de IFN- γ produzidos pelo PBMC de pacientes não tratados com TB ativa (TBA), quando estimulados com ESAT-6/CFP-10, estavam elevados em relação aos demais grupos (CS, CT e TBT). Do mesmo modo, Tavares et al. (2007) observaram que PBMC de pacientes com TB ativa produziram maiores níveis de IFN- γ em cultura quando estimulados com o antígeno ESAT-6/CFP-10, em relação aos indivíduos controles PPD negativos. O IFN- γ é uma citocina essencial para resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*, visto que a deficiência na expressão dos genes para essa citocina ou para seu receptor pode causar severidade nas infecções por *M. tuberculosis* (OTTENHOFF et al, 1998). ESAT-6 e CFP-10 têm sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas, e são reportados como antígenos promissores a serem empregados no imunodiagnóstico para TB (TAVARES et al. 2007; TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). Em humanos, Pinxteren et al. (2000) observaram que a combinação de ESAT-6 e CFP-10, quanto à produção de IFN- γ , foi eficiente para diagnosticar pacientes com TB pulmonar ativa, apresentando alta sensibilidade (73%) e especificidade (93%) em comparação a especificidade do PPD (7%). Cardoso et al. (2002) relataram que o antígeno ESAT-6 induz alta e potente resposta por células T e produção de IFN- γ , demonstrando sua habilidade em discriminar pacientes com TB ativa de indivíduos controles. Goletti et al. (2006) demonstraram que peptídeos selecionados a partir dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 obtiveram 70% de sensibilidade e 91% de especificidade para diagnosticar pacientes com TB ativa, diferenciando-os pela maior produção de IFN- γ por ELISPOT dos indivíduos controles PPD positivos e negativos. Nossos dados também mostraram que o estímulo com ESAT-6/CFP-10

no grupo de indivíduos contatos (CT) foi capaz de induzir níveis estatisticamente maiores de IFN- γ em relação aos indivíduos controles. Tavares et al. (2007) encontraram os níveis mais altos de IFN- γ em indivíduos PPD positivos após estímulo com ESAT-6/CFP-10 em PBMC em relação aos indivíduos PPD negativos.

Os dados do presente trabalho também mostraram que os pacientes com TB ativa (TBA) e os indivíduos contatos (CT) produziram níveis significativamente maiores de IL-2 em relação aos indivíduos do grupo controle sadio (CS), quando estimulados com ESAT-6/CFP-10. IL-2 e IFN- γ são importantes citocinas relacionadas com o perfil de resposta Th1 e desempenham papel na regulação da resposta antimicrobiana por disparar a ativação e proliferação de células T CD4⁺ (DERRICK et al., 2004). Zang et al. (2006) mostraram que a vacinação subcutânea com ESAT-6/CFP-10 em camundongos BALB/c estimulou a maior produção de IFN- γ e IL-2 após desafio com cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, em relação aos animais não imunizados, porém essa produção de citocinas foi menor em comparação aos camundongos imunizados com BCG. Outros estudos relataram que a expressão do gene para IL-2 estava aumentada em indivíduos com TB ativa em relação aos indivíduos controles (LAI et al., 1997). Millington et al. (2007) constataram que uma população de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e uma outra população de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-2, ambas específicas para antígenos do *M. tuberculosis*, estavam presentes durante a doença ativa em pacientes com TB.

Nossos dados indicam que pacientes com TB ativa (TBA) produziram mais TNF- α e IL-6 em comparação com os demais grupos (CS, CT, TBT) sob estímulo do antígeno ESAT-6/CFP-10. A citocina TNF- α participa juntamente com o IFN- γ na formação do granuloma, o qual limita a disseminação da infecção por *M. tuberculosis* (VANHAM et al., 1997). Além disso, essas duas citocinas combinadas induzem uma ótima ativação de macrófagos. A fagocitose do *M. tuberculosis* induz a produção de TNF- α , IL-12, intermediários reativos de nitrogênio e a expressão de moléculas co-estimulatórias. Segundo os achados de Algood, Lin e Flynn (2005), o TNF- α mostrou-se eficiente em limitar a infecção prevenindo a disseminação dos bacilos, sendo que está envolvido na fase inicial da formação do granuloma e na manutenção de sua estrutura. A inativação do TNF- α causou a atenuação da

apoptose de macrófagos alveolares humanos infectados com a espécie virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv (BALCEWICZ-SABLINSKA et al., 1998).

Assim como TNF- α , a citocina IL-6 também desempenha importante papel na TB, podendo atuar na proliferação e ativação de células T (HOLSTI e RAULET, 1989). Porém, o papel da IL-6 na resposta imunológica frente ao *M. tuberculosis* ainda é controverso. Na infecção via aerosol com *M. tuberculosis* em camundongos deficientes em IL-6 foi observado um aumento precoce na carga bacteriana com atraso simultâneo na indução de IFN- γ (SAUNDERS et al, 2000). Alguns trabalhos mostraram que esta citocina pode ser importante para indução de uma imunidade protetora do tipo Th1 durante a infecção experimental com *M. avium* (APPELBERG et al., 1994) e *M. tuberculosis* (LADEL et al., 1997). Por outro lado, Rincón et al. (1997) relataram que IL-6 pode estar envolvida na geração de um resposta do tipo Th2, estimulando células T CD4⁺ a secretarem IL-4. Segundo Lee et al. (2006) antígenos específicos do *M. tuberculosis* (MTB12 ou CFP-2) podem induzir a expressão de IL-6 e TNF- α em macrófagos de pacientes com TB.

No trabalho de Fox et al. (2007) foi observado, quanto à produção de IFN- γ por ELISPOT, que tanto os pacientes com TB ativa e quanto os contatos respondem para o antígeno ESAT-6, porém quando a estimulação ocorreu combinada ao CFP-10 a porcentagem de pacientes com TB ativa respondendo a esses antígenos aumentou em relação aos indivíduos contatos. A partir de seus dados, esses autores sugeriram que o antígeno CFP-10 foi principalmente requerido para detectar TB ativa. Este fato pode explicar porque, no presente trabalho, o grupo de pacientes com TB ativa (TBA) produziu maiores níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2 quando estimulados com ESAT-6/CFP-10 que os indivíduos contatos com pacientes TB (CT).

De acordo com os nossos dados, após o tratamento quimioterápico contra a TB, as células do sangue periférico estimuladas com o antígeno ESAT-6/CFP-10 mostraram uma diminuição nos níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 em relação às células dos pacientes com TB ativa (TBA). Os níveis das citocinas estudadas no grupo TBT se mostraram reduzidos, próximos aos níveis vistos no grupo de indivíduos controles sadios (CS). Segundo Ribeiro-Rodrigues et al. (2002) as células obtidas no escarro de pacientes com TB após o tratamento antimicobacteriano, também apresentaram níveis reduzidos de IFN- γ e TNF- α e

redução do número de bacilos, em comparação com os pacientes não tratados. O íntimo contato entre as células do escarro, os bacilos e seus produtos poderiam explicar a correlação desses resultados com os encontrados em nossas culturas estimuladas com os antígenos *M. tuberculosis*. Nos estudos de Pathan et al. (2001) foi observado que células T CD4⁺ específicas para ESAT-6 secretoras de IFN- γ diminuíram em pacientes com TB após o tratamento quimioterápico, segundo os autores este fato poderia ocorrer devido à diminuição da carga antigênica a partir do tratamento. Nicol et al. (2005) encontraram níveis aumentados de IFN- γ por ELISPOT em resposta ao PPD e ESAT-6 após um mês de tratamento em crianças com TB, e esses níveis diminuíram após três e seis meses de tratamento quimioterápico. A secreção de proteínas específicas do *M. tuberculosis*, como o ESAT-6 e CFP-10, requer bacilos viáveis e metabolicamente ativos, logo as células produtoras de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 específicas para ESAT-6/CFP-10 poderiam estar presentes em alta frequência durante a fase de ativa replicação bacteriana, o que não aconteceria com os pacientes tratados.

Sob estímulo com o antígeno ESAT-6/CFP-10 as culturas de PBMC de pacientes com TB ativa (TBA) apresentaram elevada produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 em comparação com os demais grupos, principalmente em relação aos indivíduos controles sadios (CS). E ainda nessas culturas a produção dessas citocinas diminuiu após o tratamento (nos pacientes TBT). Portanto, mais uma vez podemos sugerir que a maioria dos nossos pacientes com TB apresentavam tuberculose moderada (de acordo com a classificação proposta pela National Tuberculosis Association, 1961), pois mostraram comprometimento de um pulmão e com cavidades menores que quatro centímetros, e suas células T não apresentam imunossupressão aos antígenos do *M. tuberculosis*, proporcionando resposta no início da doença.

5.2.2. A PRODUÇÃO DE IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 NÃO DIFERENCIOU ENTRE PACIENTES COM TUBERCULOSE ATIVA E INDIVÍDUOS CONTROLES SOB ESTÍMULO COM O ANTÍGENO 16kDa

Quando as culturas de PBMC foram estimuladas com o antígeno 16kDa, os grupos estudados não diferenciaram quanto à produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2. O mesmo não ocorreu quando os grupos estudados foram estimulados com ESAT-6/CFP-10. Recentemente o antígeno ESAT-6 tem sido referido como identificador da infecção por *M. tuberculosis*, mas pouco efetivo para detectar TB latente, enquanto que o antígeno 16kDa foi sugerido como um potente marcador para indivíduos na fase de latência da infecção micobacteriana (DEMISSIE et al., 2006). No entanto, outros trabalhos mostram que os antígenos ESAT-6 e CFP-10 podem ser eficazes para diagnosticar pacientes com TB latente (ANDERSEN et al., 2007; PORSA et al., 2007; HILL et al., 2005). Conforme os nossos dados, apesar de não haver diferença estatística, o antígeno ESAT-6/CFP-10 estimulou uma maior produção IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 em relação ao antígeno 16kDa no grupo dos indivíduos contatos. Davidow et al. (2005) observaram níveis maiores de anticorpos contra ESAT-6 em pacientes com TB latente em relação aos níveis de anticorpos contra 16kDa.

Quando estimulados com 16kDa os pacientes com TB ativa (TBA) também apresentaram baixos níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 em relação ao estímulo com o antígeno ESAT-6/CFP-10 neste mesmo grupo. Isso pode ser explicado pelo antígeno 16kDa ser altamente expresso em condições adversas para o *M. tuberculosis* observadas durante o período de latência da doença. A doença ativa foi associada a baixos níveis de anticorpo anti-16kDa e a uma baixa produção de IFN- γ em resposta ao estímulo 16kDa (WILKINSON et al, 1998). Hu et al. (2006) observaram em camundongos BALB/c infectados com micobactérias mutantes, nas quais houve a perda do gene que codifica a proteína 16kDa, o aumento do crescimento bacteriano nos pulmões desses animais e ainda o aumento no número de macrófagos ativados *in vitro* infectado com esta mesma micobactéria mutante. Um rápido crescimento bacteriano e uma resposta imunológica contra antígenos ativamente secretados nas fases iniciais desse crescimento, como o ESAT-6 e o CFP-10, são mais comuns no estágio da TB ativa (SORENSEN et al. 1995), o que

pode ser demonstrado no grupo de pacientes com TB ativa não tratada (TBA), através da maior produção das citocinas estudadas após a estimulação em cultura.

5.2.3 A PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-10 E IL-4 FOI INDUZIDA NA PRESENÇA DOS ANTÍGENOS ESAT-6/CFP-10 E 16kDa NOS INDIVÍDUOS CONTATOS

As citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- β e até mesmo IL-6 são capazes de controlar a infecção por *M. tuberculosis* e podem antagonizar a resposta do tipo Th1, a qual apresenta um perfil de produção de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- α , eficientes na resposta contra infecções causadas por microrganismos intracelulares (FLYNN e CHAN, 2001a; SCHLUGER, 2001). A IL-10 pode desativar macrófagos, diminuindo a produção de IL-12 e conseqüentemente de IFN- γ , e pode desacelerar a resposta imunológica contra microrganismos, prevenindo ou limitando a patologia de uma resposta inflamatória exacerbada (TUFARIELO, CHAN e FLYNN, 2003). Esta citocina pode também afetar a migração de células dendríticas, presumivelmente por modular a expressão de receptores para quimiocinas nessas células (D'AMICO et al., 2000). Do mesmo modo que a citocina IL-10, a IL-4 também pode interferir na resposta imunológica do tipo Th1 na infecção por *M. tuberculosis*. A modulação funcional de macrófagos e a diferenciação de células T são exemplos de funções exercidas pela citocina IL-4 (PALUDAN, 1998). A IL-4 pode inibir a produção de citocinas e quimiocinas como, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IP-10 e TNF- α (BAI et al., 2004). A resposta Th2 e IL-4 são assuntos controversos na TB, sua detecção é variável e alguns trabalhos têm indicado que embora exista resposta Th2 na TB, ela é difícil de ser demonstrada.

A partir da análise dos nossos dados os pacientes com TB (TBA e TBT) não apresentaram elevada produção de IL-10 e IL-4 quando estimulados com os antígenos ESAT-6/CFP-10 e 16kDa quando comparados aos outros grupos (CS e CT). Uma possível explicação para este fato é que altos níveis de IL-10 e IL-4 têm sido detectados em pacientes com TB severa, isto pode refletir o papel regulatório dessas citocinas na progressão da doença (ROOK et al., 2004), assim acredita-se que este não foi o caso dos pacientes estudados no presente trabalho. Alta

freqüência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando IL-4 foi encontrada em indivíduos com TB cavitária, o que também foi associado com o aumento da carga de bacilos (CREVEL et al., 2000). Camundongos com alta expressão de IL-10 tiveram aumento da carga bacteriana nos estágios tardios da infecção por *M. tuberculosis* (TURNER et al., 2002). Bai et al. (2004) através de morfometria mostraram que a expressão de IL-10 e IL-4 nos pulmões de pacientes com TB ativa foi significativamente diminuída em relação aos controles saudáveis. Nos trabalhos de Hughes et al. (2005) foi observado que 100% dos pacientes com TB estudados tiveram resposta positiva de células T CD4 para o antígeno ESAT-6 quanto à produção de IFN- γ , enquanto que somente 4 (25%) e 5 (31,2%) de 16 indivíduos tiveram essa mesma resposta quanto à produção de IL-4 e IL-10, respectivamente.

Os níveis de IL-10 e IL-4, nas culturas estimuladas com o antígeno ESAT-6 /CFP-10, estavam elevados nos indivíduos controles saudáveis (CS) e principalmente nos indivíduos contatos (CT) em comparação aos pacientes TB (TBA e TBT). A citocina IL-4 teve uma maior produção no grupo de indivíduos contatos CT quando estimulados com o antígeno ESAT-6/CFP-10 em nosso trabalho, assim como encontrado por Demisse et al. (2006), cuja elevada expressão de IL-4 foi associada à forte resposta ao antígeno ESAT-6 nos indivíduos contatos quando comparados ao grupo controle saudável. Porém, esses autores correlacionaram este fato à baixa expressão de IFN- γ no grupo de indivíduos contatos quando estimulados com tal antígeno. Isso não foi observado em nossos dados, visto que os níveis de IFN- γ não estavam diminuídos em relação aos níveis de IL-4 e IL-10 nas culturas de PBMC estimuladas com ESAT-6 /CFP-10 no grupo de indivíduos contatos (CT).

O antígeno 16kDa também estimulou elevada produção de IL-10 nos grupos CS e CT, diferenciando-os estatisticamente dos grupos de pacientes TB (TBA e TBT). Os níveis de IL-4 também estavam elevados nos grupos CS e CT em relação aos pacientes TB (TBA e TBT), porém não houve diferença estatística entre os grupos quanto à produção desta citocina. Além de se tratar de um antígeno altamente expresso na fase de latência da infecção por *M. tuberculosis*, o 16kDa também está presente na cepa vacinal do BCG e em outros tipos de micobactérias ambientais (YUAN et al., 1996; OFTUNG, BORKA e MUSTAFA 1998). Logo, nos grupos de indivíduos controles saudáveis (CS) e de indivíduos contatos com pacientes TB (CT) poderia haver uma maior quantidade de células específicas para este

antígeno que nos grupos de pacientes TB (TBA e TBT), sendo que os indivíduos dos grupos CS e CT são provenientes de área endêmica, possivelmente apresentam bacilos latentes, e ainda foram vacinados com BCG. Agrewala e Wilkinson (1998) observaram a existência de clones específicos de células T, no PBMC humano de indivíduos PPD+, produtoras de IL-4 para certos peptídeos encontrados no antígeno 16kDa, e também encontraram clones específicos de células T produtoras de IFN- γ para outras porções peptídicas deste antígeno. No entanto, os autores discutem que a vacinação com o antígeno total pode gerar uma resposta do tipo Th2 ou até mesmo a produção de citocinas regulatórias, como a IL-10, e predispor os indivíduos a susceptibilidade à TB. A secreção de citocinas como a IL-4 e a IL-10, as quais podem ter ações antagonistas em relação às citocinas IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-6 e TNF- α , podem garantir um ambiente favorável a replicação e disseminação do *M. tuberculosis*. Talvez essa fosse uma das funções do antígeno 16kDa, um antígeno sintetizado durante o período de latência, o qual assegurasse o balanço entre citocinas Th1/Th2, poderia garantir a sobrevivência de bacilos viáveis durante este estágio do doença.

5.2.4 ANTÍGENO ESAT-6/CFP-10 ESTIMULOU A PRODUÇÃO DE MIG, IP-10, IL-8 E RANTES EM PACIENTES COM TB ATIVA, ENQUANTO O ANTÍGENO 16kDa ESTIMULOU A PRODUÇÃO DE MCP-1 EM INDIVÍDUOS CONTROLES E CONTATOS

Um grande número de quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1 α , IP-10, MIG e IL-8, secretadas por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais brônquicas, são altamente expressas durante a infecção por *M. tuberculosis* (SEILER et al., 2003).

Os grupos de pacientes com TB ativa não tratada (TBA) e de indivíduos contatos (CT) produziram uma maior quantidade das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES em relação aos grupos controle sadio (CS) e pacientes tratados (TBT), quando suas PBMC foram estimuladas com o antígeno ESAT-6/CFP-10. Este perfil de produção foi observado também quanto à produção das citocinas inflamatórias

IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 pelas PBMC quando estimuladas com este mesmo antígeno, como mostrado anteriormente.

MIG e IP-10 compartilham o mesmo receptor, o CXCR3, expresso em linfócitos T ativados por IL-2, mas não em linfócitos T em repouso, sugerindo que essas duas quimiocinas atraem linfócitos T ativados através desse receptor (LOETSCHER et al, 1996). Nos trabalhos de Abramo et al. (2006) foi mostrada uma forte correlação entre a produção de IFN- γ e MIG por PBMC humana de pacientes com TB após estímulo com antígeno ESAT-6/CFP-10, além disso, esses pacientes produziram maiores níveis de IFN- γ e MIG em relação aos indivíduos controles saudáveis. Bai et al. (2004) encontraram níveis de IFN- γ e IP-10 aumentados nas áreas inflamatórias do granuloma, em biopsias de pulmões de pacientes com TB. Segundo os achados de Chiu et al. (2003), o uso de anti- IFN- γ em camundongos influenciou na depleção da expressão de RNAm para MIG e IP-10, durante a resposta à TB. Os nossos dados estão de acordo com esses achados já que IP-10, MIG e IFN- γ apresentaram o mesmo perfil de produção pelas PBMC dos grupos estudados quando estimulados pelos antígenos do *M. tuberculosis*.

Nossos resultados quanto à produção de IP-10, MIG e IFN- γ nas culturas de PBMC, quando estimuladas com ESAT-6/CFP-10 diminuíram com o tratamento quimioterápico anti-TB, condizem com os achados de Azzurri et al. (2005), nos quais os níveis plasmáticos de IP-10 também diminuíram após o tratamento anti-TB nos pacientes curados.

A expressão da quimiocina pró-inflamatória IL-8 é fracamente induzida por IFN- γ , mas fortemente estimulada através da produção de TNF- α e IL-1 (STANDIFORD et al., 1990). Assim como os níveis de TNF- α na cultura de PBMC estimuladas com ESAT-6/CFP-10, os níveis de IL-8 foram maiores nos grupos TBA e CT em relação aos outros grupos (TBT e CS). O'kane et al. (2007) mostraram que a inibição de TNF- α ou IL-1 anula a produção de IL-8 em fibroblastos pulmonares humanos quando cultivados em meio condicionado com monócitos infectados com *M. tuberculosis*. Os autores ainda observaram que níveis exógenos de IL-8 reduziram a sobrevivência desta micobactéria, e a inibição da síntese de IL-8 estava associada com a proliferação intracelular bacteriana. Além disso, Ulrichs et al. (1998) encontraram níveis de RNAm para IL-8 elevados nas culturas de PBMC de pacientes com TB em relação aos controles saudáveis estimuladas com ESAT-6.

Monócitos sanguíneos e macrófagos alveolares infectados com *M. tuberculosis* são capazes de produzir RANTES, que atrai linfócitos T e monócitos/macrófagos, e ainda esta quimiocina pode inibir o crescimento intracelular do *M. tuberculosis* (SADEK et al, 1998; SAUKKONEN et al, 2002). Nossos dados mostram que o antígeno ESAT-6/CFP-10 foi capaz de induzir uma maior produção de RANTES nos pacientes com TB ativa (TBA) e nos indivíduos contatos (CT) em comparação aos grupos controle e de pacientes tratados (TBT). Stegelmann et al. (2005) demonstraram que macrófagos infectados com *M. tuberculosis* apresentavam expressão de RANTES somente nos indivíduos controles, os quais já tinham sido previamente expostos a esta micobactéria, isso pode explicar o fato do grupo CT apresentar níveis de RANTES elevados em relação aos controles sadios (CS), quando estimulados com ESAT-6/CFP-10.

Tratando-se da produção das quimiocinas estudadas em relação ao estímulo 16kDa, como visto na produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2, não foi possível diferenciar os grupos estudados quanto à produção das quimiocinas MIG, IP-10, IL-8 e RANTES por PBMC humanas estimuladas com esse antígeno.

A infecção de uma linhagem de células alveolares epiteliais humanas com *M. tuberculosis* foi capaz de induzir a produção de MCP-1, sugerindo que o bacilo estimulou a produção de quimiocinas em células alveolares epiteliais contribuindo para a resposta inflamatória local atraindo monócitos, linfócitos e neutrófilos (TAUB et al., 1995; LIN et al., 1998). Culturas de PBMC respondendo ao ESAT-6 mostraram síntese RNAm para MCP-1, IL-8 e IFN- γ (ULRICHS, 1998). Porém, Hasan et al (2005) mostraram níveis séricos elevados de IL-8, mas não MCP-1, em pacientes com TB ativa (pulmonar e extrapulmonar) em comparação com controles de área endêmica vacinados com BCG. Em nossos resultados os níveis de MCP-1 foram maiores nos grupo CS em relação aos demais, quando estimulados com o antígeno ESAT-6/CFP-10, e foram altamente elevados nos grupos CS e CT em comparação aos pacientes com TB (TBA e TBT), quando estimulados com o antígeno 16kDa. PBMC de pacientes com TB pulmonar mostraram níveis diminuídos de MCP-1 em relação aos indivíduos saídos PPD+ e aos pacientes com TB crônica, quando estimulados com PPD ou com antígeno 30kDa proveniente do *M. tuberculosis* (LEE et al., 2003). Assim como a produção da citocina IL-10, nas culturas de PBMC, se apresentou mais elevadas nos grupos CS e CT em relação aos pacientes com TB, quando estimuladas com o antígeno 16kDa, MCP-1 também mostrou o mesmo

padrão de produção. Em estudos genéticos de Flores-Villanueva et al. (2005) foi observado que pessoas com genótipo para marcante produção de MCP-1 podem ter a produção de IL-12 inibida, em resposta ao *M. tuberculosis*, aumentando a probabilidade que a infecção progrida para fase ativa. Como discutido anteriormente, esta relação do antígeno 16kDa com a estimulação de citocinas como IL-4, IL-10, e agora com a quimiocina MCP-1 em indivíduos controles e contatos, pode favorecer o balanço entre o perfil de resposta Th1/Th2, possivelmente diminuindo a secreção de citocinas e quimiocinas favoráveis a eliminação do bacilo, sendo benéfico para o *M. tuberculosis* em períodos críticos como o de latência.

Os níveis de MIG, IP-10, IL-8 e RANTES produzidos em cultura de PBMC quando estimuladas com o antígeno ESAT-6/CFP-10 nos grupos de indivíduos controles sadios (CS), e de pacientes TB (TBA e TBT) correlacionaram com os dados obtidos através da produção dessas mesmas quimiocinas dosadas no plasma. Já os níveis de MCP-1, produzidos pelas culturas de PBMC estimuladas com antígenos do *M. tuberculosis*, não correlacionaram com os níveis dessa quimiocina no plasma nos grupos de indivíduos controles sadios (CS), e de pacientes TB (TBA e TBT). Além disso, no plasma os níveis de MCP-1 foram extremamente menores em relação aos níveis dessa quimiocina dosadas em cultura, o mesmo aconteceu com IL-8 e RANTES. A concentração sérica ou plasmática de citocinas não reflete a produção dessas em PBMC estimuladas em cultura com antígenos do *M. tuberculosis*, por serem duas situações diferentes (VANKAYALAPATI et al, 2003). O estudo das citocinas e quimiocinas plasmáticas reflete a síntese dessas proteínas “in vivo” produzidas durante a doença. Na cultura é criado um microambiente propício para simular a resposta celular “in vivo” frente ao patógeno. Porém, este microambiente pode sofrer influência de diferentes variáveis como o tipo de célula, sua quantidade, o antígeno que é dado como estímulo, a concentração que é usada, os reagentes usados, meios de cultura, temperatura e tempo de incubação, entre outras.

Vários estudos têm sido realizados sobre TB nos últimos anos. Os conhecimentos sobre a resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*, como esta evolui durante e após o tratamento, os componentes desta resposta e como eles interagem entre si são fundamentais no auxílio para conter, de forma eficaz, a disseminação da doença. Muitos elementos do sistema imunológico, como as citocinas e as quimiocinas são necessários para uma resposta protetora contra o *M.*

tuberculosis. Um entendimento claro da indução dessa resposta é importante para o progresso das pesquisas em novos métodos de tratamento, diagnóstico e vacinas contra a TB.

6. CONCLUSÃO

Em nosso trabalho foi observado que a produção plasmática das quimiocinas MIG, IP-10 e IL-8 também foi capaz de discriminar pacientes com tuberculose ativa de indivíduos controles sadios e de pacientes tratados. Além disso, análise de quimiocinas plasmáticas pode contribuir para monitoramento do tratamento quimioterápico anti-TB.

Este é um trabalho pioneiro ao estudar um vasto número de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10 e IL-4) e quimiocinas (MIG, IP-10, IL-8, RANTES e MCP-1) na resposta imunológica contra TB, principalmente frente ao estímulo 16kDa.

O estudo da produção de citocinas e quimiocinas na TB contribui para o entendimento da resposta imunológica frente ao patógeno *M. tuberculosis*. No caso dos antígenos pesquisados no presente trabalho, ESAT-6/CFP-10 e 16kDa, foi possível observar um perfil de resposta imunológica interessante nos grupos estudados. O antígeno ESAT-6/CFP-10 foi capaz de induzir uma maior produção de IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α , MIG, IP-10, IL-8 e RANTES nas culturas de PBMC de pacientes não tratados com tuberculose ativa, em comparação aos demais grupos. A produção dessas citocinas e quimiocinas diante do estímulo antigênico pode refletir a interação entre o organismo hospedeiro e o patógeno, na qual as células de indivíduos doentes produzem moléculas, como as citocinas e quimiocinas, na tentativa de eliminar a infecção. As PBMC estimuladas com o antígeno 16kDa produziram maiores níveis de IL-10 e MCP-1 nos indivíduos contatos com pacientes TB (CT) em relação aos pacientes TB (TBA e TBT).

O ensaio citométrico de esferas ordenadas (CBA - "Cytometric Bead Array") utilizado neste trabalho não é um método de baixo custo. Por se tratar de um kit capaz de dosar até 200 amostras por vez, limitou um pouco nossos estudos quanto à diluição das amostras, ao uso de mais antígenos, ao tempo de cultura das PBMC e quanto ao aumento do número de amostras estudadas. Porém o método de CBA é capaz de quantificar simultaneamente várias substâncias em um volume pequeno de amostra, em um tempo menor, em comparação com os imunoenaios tradicionais (MORGAN et al., 2004), e apesar das limitações se mostrou eficiente quanto aos objetivos propostos neste estudo

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, L.; SAADOUN, D.; CALATRONI, I.; LAUNAY, O.; MÉMAIN, N.; VINCENT, V.; MARCHAL, G.; DUPONT, B.; BOUCHAUD, O.; VALEYRE, D.; LORTHOLARY, O. 2004. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. **Clinical Microbiology and Infection**, **10**: 388-398.

ABRAMO, C.; MEIJGAARDEN, K. E.; GARCIA, D.; FRANKEN, K. L.; KLEIN, M. R.; KOLK, A. J.; OLIVEIRA, S. C.; OTTENHOFF, T. H.; TEIXEIRA, H. C. 2006. Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma response to a fusion protein of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. **Microbes and Infection**, **8 (1)**: 45-51.

AGREWALA, J. N.; WILKINSON, R. J. 1998. Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91-110 and p21-40 peptides of the 16-kD alpha-crystallin antigen of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical & Experimental Immunology**, **114(3)**: 392-397.

ALESSANDRI, A. L.; SOUZA, A. L.; OLIVEIRA, S. C.; MACEDO, G. C.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. 2006. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. **Inflammation Research**, **55 (12)**: 528-533.

ALGOOD, H.M.; CHAN, J.; FLYNN, J.L. 2003. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine & Growth factor reviews**, **14 (6)**: 467-477.

ALGOOD, H. M.; LIN, P. L.; FLYNN, J. L. 2005. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, **41**: S189-193.

ANDERSEN, P.; ANDERSEN, A. B.; SORENSEN, A. L.; NAGAI, S. 1995. Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **The Journal of Immunology**, **154**: 3359–3372.

ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M.; PAI, M.; WELDINGH, K. 2007. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? **Trends in Molecular Medicine**, **13 (5)**: 175-182.

APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; PEDROSA, J.; MINOPRIO, P. 1994. Role of interleukin 6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. **Immunology**, **82 (3)**: 361–364.

AREND, S. M.; ANDERSEN, P.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; SKJOT, R. L.; SUBRANTO, Y. W.; VAN DISSEL, J. T.; OTTENHOFF, T. H. 2000. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. **The Journal of Infectious Diseases**, **181 (5)**: 1850-1854.

AREND, S. M.; ENGELHARD, A. C.; GROOT, G.; DE BOER, K.; ANDERSEN, P.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DISSEL, J. T. 2001. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **8**: 1089-1096.

AZZURRI, A.; SOW, O. Y.; AMEDEI, A.; BAH, B.; DIALLO, S.; PERI, G.; BENAGIANO, M.; D'ELIOS, M. M.; MANTOVANI, A.; DEL PRETE, G. 2005. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes and Infection**, **7**: 1-8.

BADEWA, A. P.; QUINTON, L. J.; SHELLITO, J. E.; MASON, C.M. 2005. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis. **Tuberculosis**, **85 (3)**: 185-195.

BAI, X.; WILSON, S. E.; CHMURA, K.; FELDMAN, N. E.; CHAN, E. D. 2004. Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, **84 (6)**: 375-385.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; KEANE, J.; KORNFELD, H.; REMOLD, H. G. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. **The Journal of Immunology**, **161 (5)**: 2636-2641.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J. 2000. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, **18**: 767–811.

BARNES, P. F.; BLOCH, A. B.; DAVIDSON, P.T.; SNIDER JR, D. E. 1991. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. **The New England Journal of Medicine**, **324**: 1644-1650.

BARNES, P. F.; ABRAMS, J. S.; LU, S.; SIELING, P. A.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. 1993. Patterns of cytokine production by Mycobacterium-reactive human T-cell clones. **Infection and Immunity**, **61**: 197–203.

BEAN, A. G.; ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; FRANCE, M. P.; KORNER, H.; SEDGWICK, J. D.; BRITTON, W. J. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **The Journal of Immunology**, **162**: 3504–3511.

BEKKER, L. G.; MAARTENS, G.; STEYN, L.; KAPLAN, G. 1998. Selective increase in plasma TNF- α and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. **The Journal of infectious diseases**, **178 (2)**: 580–584.

BEKKER, L. G.; MOREIRA, A. L.; BERGTOLD, A.; FREEMAN, S.; RYFFEL, B.; KAPLAN, G. 2000. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. **Infection and Immunity**, **68 (12)**: 6954-6961.

BERTHET, F. X.; RAMUSSEN, P. B.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P.; GICQUEL, B. 1998. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). **Microbiology**, **144**: 3195–3203.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, **320 (6063)**: 584-588.

BINGISSER, R.; STEY, C.; WELLER, M.; GROSCURTH, P.; RUSSI, E.; FREI, K. 1996. Apoptosis in human alveolar macrophages is induced by endotoxin and is modulated by cytokines. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, **15**: 64–70.

BLANCHARD, D. K.; MICHELINI-NORRIS, M. B.; FRIEDMAN, H.; DJEU, J. Y. 1989. Lysis of mycobacteria-infected monocytes by IL-2 activated killer cells: role of LFA-1. **Cellular Immunology**, **119** : 402-411.

BOESEN, H.; JENSEN, B. N.; WILCKE, T.; ANDERSEN, P. 1995. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, **63 (4)**: 1491–1497.

BOOM, W. H. 2007. New TB vaccines: is there a requirement for CD8 T cells? **The Journal of Clinical Investigation**, **117 (8)**: 2092-2094.

BORING, L. J.; GOSLING, S. W.; CHENSUE, S. L.; KUNKEL, R. V.; FARESE, JR.; BROXMEYER, H. E.; CHARO, I. F. 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. **The Journal of Clinical Investigation**, **100 (10)**: 2552–2561.

BOROS, D. L. 1999. T helper cell populations, cytokine dynamics, and pathology of the schistosome egg granuloma. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, **1**: 511–516.

BOUSSIOTIS, V. A.; TSAI, E. Y.; YUNIS, E. J.; THIM, S.; DELGADO, J. C.; DASCHER, C. C.; BEREZOVSKAYA, A.; ROUSSET, D.; REYNES, J. M.; GOLDFELD, A. E. 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **The Journal of Clinical Investigation**, **105 (9)**: 317-325.

CACCAMO, N.; MILANO, S.; DI SANO, C.; CIGNA, D.; IVANYI, J.; KRENSKY, A. M.; DIELI, F.; SALERNO, A. 2002. Identification of epitopes of Mycobacterium tuberculosis 16-kDa protein recognized by human leukocyte antigen-A*0201 CD8(+) T lymphocytes. **The Journal of infectious diseases**, **186 (7)**: 991-998.

CACCAMO, N.; BARERA, A.; DI SANO, C.; MERAVIGLIA, S.; IVANYI, J.; HUDECZ, F.; BOSZE, S.; DIELI, F.; SALERNO, A. 2003. Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4+ T clones specific for an immunodominant epitope of Mycobacterium tuberculosis 16-kDa protein. **Clinical and Experimental Immunology**, **133 (2)**: 260-266.

CALLEJA, C.; PASCUSI, J. M.; MANI, J. C.; MAUREL, P.; VILAREM, M. J. 1998. The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. **Nature medicine**, **4 (1)**: 92-96.

CAMPBELL, E. M.; PROUDFOOT A. E.; YOSHIMURA T.; ALET, B.; WELLS, T. N.; WHITE, A. M.; WESTWICK, J.; WATSON, M. L. 1997. Recombinant guinea pig and human RANTES activate macrophages but not eosinophils in the guinea pig. **The Journal of Immunology**, **159 (3)**: 1482–1489.

CARDOSO, F. L. L.; ANTAS, P. R. Z.; MILAGRES, A. S.; GELUK, A.; FRANKEN, K. L. M. C.; OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, H. C.; NOGUEIRA, S. A.; SARNO, E. N.;

KLATSER, P.; OTTENHOFF, T. H. M.; SAMPAIO, E. P. 2002. T-Cell Responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Antigen ESAT-6 in Brazilian Tuberculosis Patients. **Infection and Immunity**, **70 (12)**: 6707-6714.

CARUSO, A. M.; SERBINA, N.; KLEIN, E.; TRIEBOLD, K.; BLOOM, B. R.; FLYNN, J. L. 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. **The Journal of Immunology**, **162**: 5407-5416.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Treatment of tuberculosis. American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America.** Morbidity and Mortality Weekly Report 2003; 52 (No RR-11).

CHAN, E. D.; CHAN, J.; SCHLUGER, N. W. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, **25**: 606–612.

CHANTRY, D.; TURNER, M.; ABNEY, E.; FELDMANN, M. 1989. Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. **The Journal of Immunology**, **142 (4)**: 4295–4300.

CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K. S.; ALLENSPACH, E. J.; LU, B.; GERARD, C.; KUNKEL, S. L.; LUKACS, N. W. 1999. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. **The Journal of Immunology**, **163 (1)**: 165-173.

CHIU, B. C.; SHANG, X.; FRAIT K. A.; HU, J. S.; KOMUNIECKI, E.; MILLER, R. A.; CHENSUE, S. W. 2002. Differential effects of ageing on cytokine and chemokine responses during type-1 (mycobacterial) and type-2 (schistosomal) pulmonary granulomatous inflammation in mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, **123 (4)**: 313-326.

CHIU, B. C.; FREEMAN, C. M.; STOLBERG, V. R.; KOMUNIECKI, E.; LINCOLN, P. M.; KUNKEL, S. L.; CHENSUE, S. W. 2003. Cytokine-chemokine networks in experimental mycobacterial and schistosomal pulmonary granuloma formation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, **29**: 106-116.

COHEN, S. B.; CRAWLEY, J. B.; KAHAN, M. C.; FELDMANN, M.; FOXWELL, B. M. 1997. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. **Immunology**, **92**: 1–5.

COOPER, A.M.; ADAMS, L.B.; DALTON, D.K.; APPELBERG, R.; EHLERS, S. 2002. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends in microbiology**, **10 (5)**: 221-226.

CORBETT, E. L.; WATT, C. J.; WALKER, N.; MAHER, D.; WILLIAMS, B. G.; RAVIGLIONE, M. C.; DYE, C. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Archives of Internal Medicine**, **163**: 1009-1021.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. 2003. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Review Microbiology**, **57**: 641-676.

CREVEL, V. R.; KARYADI, E.; PREYERS, F.; LEENDERS, M.; KULLBERG, B. J.; NELWAN, R. H.; VAN DER MEER, J. W. 2000. 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 diseases**, **181 (3)**: 1194-1197.

CREVEL, R. V.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, **15 (2)**: 294-309.

CUNNINGHAM, A. F.; SPREADBURY, C. L. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. **The Journal of Bacteriology**, **180 (4)**: 801-808.

D'AMICO, G.; FRASCAROLI, G.; BIANCHI, G. TRANSIDICO, P.; DONI, A.; VECCHI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. 2000. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. **Nature Immunology**, **1 (5)**: 387-391.

DANIEL, T. M. 2006. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, **100**: 1862-1870.

DAVIDOW, A.; KANAUIA, G. V.; SHI, L.; KAVIAR, J.; GUO, X.; SUNG, N.; KAPLAN, G.; MENZIES, D.; GENNARO, M. L. 2005. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. **Infection and Immunity**, **73 (10)**: 6846-6851.

DE VALLIERE, S.; ABATE, G.; BLAZEVIC, A.; HEUERTZ, R. M.; HOFT, D. F. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. **Infection and Immunity**, **73**: 6711-6720.

DEMANGEL, C.; GARNIER, T.; ROSENKRANDS, I.; COLE, S. T. 2005. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. **Infection and Immunity**, **73 (4)**: 2190-2196.

DEMISSIE, A.; ABEBE, M.; ASEFFA, A.; ROOK, G.; FLETCHER, H.; ZUMLA, A.; WELDINGH, K.; BROCK, I.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M.; VACSEL STUDY GROUP. 2004. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. **The Journal of Immunology**, **172 (11)**: 6938-6943.

DEMISSIE, A.; WASSIE, L.; ABEBE, M.; ASEFFA, A.; ROOK, G.; ZUMLA, A.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M.; VACSEL STUDY GROUP. 2006. The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. **Infection and Immunity**, **74 (5)**: 2817-2822.

DERRICK, S. C.; REPIQUE, C.; SNOY, P.; YANG, A. L.; MORRIS, S. 2004. Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **72**: 1685-1692.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, **141 (7)**: 2407-2412.

DLUGOVITZKY, D.; BAY, M. L.; RATENI, L.; FIORENZA, G.; VIETTI, L.; FARRONI, M. A.; BOTTASSO, O. 2000. A Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). **Clinical and Experimental Immunology**, **122**: 343-349.

DOHERTY, T. M.; ARDITI, M. 2004. TB or not TB: that is the question - does TLR signaling hold the answer? **The Journal of Clinical Investigation**, **114 (12)**: 1790-1799.

DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J. H.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology**, **168 (7)**: 3195-3204.

DYE, C. 2006. Global epidemiology of tuberculosis. **Lancet**, **367**: 938-940.

EHLERS, S. 2003. Pathomorphogenesis of tubercular histologic changes: mechanisms of granuloma formation, maintenance and necrosis. **Der Internist**, **44 (11)**: 1363-1373.

ERUSLANOV, E. B.; LYADOVA, I. V.; KONDRATIEVA, T. K.; MAJOROV, K. B.; SCHEGLOV, I. V.; ORLOVA, M. O.; APT, A. S. 2005. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infection and Immunity**, **73**: 1744-1753.

FAN, X. L.; YU, T. H.; GAO, Q.; YAO, W. 2006. Immunological properties of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strain expressing fusion protein IL-2-ESAT-6. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, **38 (10)**: 683-690.

FILHO, A. C.; KRITSKI, A. L.; BARRETO, A. W.; LEMOS, A. C. M.; NETTO, A.R.; GUIMARÃES, C.A. et al. 2004. Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **30 (Supl 1)**: 1-55.

FLAHERTY, D.K.; VESOSKY, B.; BEAMER, G.L.; STROMBERG, P.; TURNER, J. 2006. Exposure to *Mycobacterium avium* can modulate established immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. **Journal of Leukocyte Biology**, **80**: 1262-1271.

FLETCHER, H.A. 2007. Correlates of immune protection from tuberculosis. **Current Molecular Medicine**, **7 (3)**: 319-325.

FLORES-VILLANUEVA, P. O.; RUIZ-MORALES, J. A.; SONG, C. H.; FLORES, L. M.; JO, E. K.; MONTAÑO, M.; BARNES, P. F.; SELMAN, M.; GRANADOS, J. 2005. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, **202 (12)**: 1649-1658.

FLORIDO, M.; APPELBERG, R.; ORME, I.M.; COOPER, A.M. 1997. Evidence for a reduced chemokine response in the lungs of beige mice infected with *Mycobacterium avium*. **Immunology**. **90(4)**:600-6.

FLORIDO, M.; COOPER, A. M.; APPELBERG, R. 2002. Immunological basis of the development of necrotic lesions following *Mycobacterium avium* infection. **Immunology**, **106**: 590–601.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C.J .; SCHREIBER, R.; MAK, T. W.; BLOOM, B. R. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, **2 (6)**: 561-572.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. 2001a. Immunology of Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**. **19**: 93–129.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. 2001b . Tuberculosis: Latency and Reactivation. **Infection and Immunity**, **69 (7)**: 4195–4201.

FLYNN, J. L. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, **84 (2)**: 93-101.

FORTUNE, S. M.; JAEGER, A.; SARRACINO, D. A.; CHASE M. R.; SASSETTI C. M.; SHERMAN, D. R.; BLOOM, B. R.; RUBIN E. J. 2005. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, **102 (30)**: 10676–10681.

FOX, A.; JEFFRIES, D. J.; HILL, P. C.; HAMMOND, A. S.; LUGOS, M. D.; JACKSON-SILLAH, D.; DONKOR, S. A.; OWIAFE, P. K.; MCADAM, K. P.; BROOKES, R. H. 2007. ESAT-6 and CFP-10 can be combined to reduce the cost of testing for *Mycobacterium tuberculosis* infection, but CFP-10 responses associate with active disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **101 (7)**: 691-698.

FRIEDEN, T. R.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J.; DYE, C. 2003. Tuberculosis. **Lancet**, **362 (9387)**: 887-899.

GELUK, A.; LIN, M. Y.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; LEYTEN, E. M.; FRANKEN, K. L.; OTTENHOFF, T. H.; KLEIN, M. R. 2007. T-cell recognition of the HspX protein of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with latent *M. tuberculosis* infection but not with *M. bovis* BCG vaccination. **Infection and Immunity**, **75 (6)**: 2914-2921.

GEVAUDAN, M. J.; BOLLET, C.; CHARPIN, D.; MALLET, M. N.; DE MICCO, P. 1992. Serological response of tuberculosis patients to antigen 60 of BCG. **European Journal of Epidemiology**, **8 (5)**: 666-676.

GIRI, P. K.; VERMA, I.; KHULLER, G. K. 2006. Protective efficacy of intranasal vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG against airway *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. **Journal of Infection**, **53 (5)**: 350-356.

GOLETTI, D.; CARRARA, S.; VINCENTI, D.; SALTINI, C.; RIZZI, E. B.; SCHININA, V.; IPPOLITO, G.; AMICOSANTE, M.; GIRARDI, E. 2006. Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. **Clinical Microbiology and Infection**, **12 (6)**: 544-550.

GONZALEZ-JUARRERO, M.; TURNER, O. C.; TURNER, J.; MARIETTA, P.; BROOKS, J. V.; ORME, I. M. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **69**: 1722-1728.

GRODE, L.; SEILER, P.; BAUMANN, S.; HESS, J.; BRINKMANN, V.; EDDINE, A. N.; MANN, P.; GOOSMANN, C.; BANDERMANN, S.; SMITH, D.; BANCROFT, G. J.; REYRAT, J. M.; VAN SOOLINGEN, D.; RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. **The Journal of Clinical Investigation**, **115 (9)**: 2472-2479.

GUINN, K. M.; HICKEY, M. J.; MATHUR, S. K.; ZAKEL, K. L.; GROTZKE, J. E.; LEWINSOHN, D. M.; SMITH, S.; SHERMAN, D. R. 2004. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, **51**: 359-370.

GU, L.; RUTLEDGE, B.; FIORILLO, J.; ERNST, C.; GREWAL, I.; FLAVELL, R.; GLADUE, R.; ROLLINS, B. 1997. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. **Journal of Leukocyte Biology**, **62 (5)**: 577-580.

GUPTA, S.; KUMARI, S.; BANWALIKAR, J. N.; GUPTA, S. K. 1995. Diagnostic utility of the estimation of mycobacterial Antigen A60 specific immunoglobulins IgM, IgA and IgG in the sera of cases of adult human tuberculosis. **Tubercle and Lung Disease**, **76 (5)**: 418-424.

HASAN, Z.; ZAIDI, I.; JAMIL, B.; KHAN, M. A.; KANJI, A.; HUSSAIN, R. 2005. Elevated ex vivo monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) in pulmonary as compared with extra-pulmonary tuberculosis. **BMC Immunology**, **6**: 14-23.

HAYMAN, J. 1984. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? **Lancet** **2**: 1015–1016.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, **159**: 635–643.

HERNANDEZ-PANDO, R.; OROZCO, H.; ARRIAGA, K.; SAMPIERI, A.; LARRIVA-SAHD, J.; MADRID-MARINA, V. 1997. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, **90**: 607–617.

HERRMANN, J. L.; LAGRANGE, P. H. 2005. Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse? **Pathologie-biologie**, **53** (1): 35-40.

HILL, P. C.; JACKSON-SILLAH, D.; FOX, A.; FRANKEN, K. L.; LUGOS, M. D.; JEFFRIES, D. J.; DONKOR, S. A.; HAMMOND, A. S.; ADEGBOLA, R. A.; OTTENHOFF, T. H.; KLEIN, M. R.; BROOKES, R. H. 2005. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *mycobacterium tuberculosis* infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. **Journal of clinical microbiology**, **43** (5): 2070-2074.

HOFT, D. F.; WORKU, S.; KAMPMANN, B.; WHALEN, C. C.; ELLNER, J. J.; HIRSCH, C. S.; BROWN, R. B.; LARKIN, R.; LI, Q.; YUN, H.; SILVER, R. F. 2002. Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of *mycobacterial* growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. **The Journal of infectious diseases**, **186**: 1448-1457.

HOHEISEL, G.; IZBICKI, G.; ROTH, M.; CHAN, C. H.; LEUNG, J. C.; REICHENBERGER, F.; SCHAUER, J.; PERRUCHOUD, A. P. 1998. Compartmentalization of pro-inflammatory cytokines in tuberculous pleurisy. **Respiratory medicine**, **92**: 14-17.

HOLSTI, M. A.; RAULET, D. H. 1989. IL-6 and IL-1 synergise to stimulate IL-2 production and proliferation of peripheral T cells. **Journal of Immunology**, **143**: 2514-2519.

HORI, S.; CARVALHO, T.; DEMENGEOT, J. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. **European journal of immunology**, **32**:1282–1291.

HORWITZ, M. A.; HARTH, G.; DILLON, B. J.; MASLESA-GALIC' S. 2000. Recombinant bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **97 (25)**: 13853–13858.

HSU, T.; HINGLEY-WILSON, S. M.; CHEN, B.; CHEN, M.; DAI, A. Z.; MORIN, P. M.; MARKS, C. B.; PADIYAR, J.; GOULDING, C.; GINGERY, M.; EISENBERG, D.; RUSSELL, R. G.; DERRICK, S. C.; COLLINS, F. M.; MORRIS, S. L.; KING, C. H.; JACOBS, W. R. JR. 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **100**: 12420–12425.

HU, Y.; MOVAHEDZADEH, F.; STOKER, N. G.; COATES, A. R. 2006. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. **Infection and Immunity**, **74 (2)**: 861-868.

HUGHES, A. J.; HUTCHINSON, P.; GOODING, T.; FREEZER, N. J.; HOLDSWORTH, S. R.; JOHNSON, P. D. 2005. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. **Clinical and Experimental Immunology**, **142 (1)**: 132-139.

JACOBS, M.; TOGBE, D.; FREMOND, C.; SAMARINA, A.; ALLIE, N.; BOTHA, T.; CARLOS, D.; PARIDA, S. K.; GRIVENNIKOV, S.; NEDOSPASOV, S.; MONTEIRO, A.; LE BERT, M.; QUESNIAUX, V.; RYFFEL, B. 2007. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. **Microbes and Infection**, **9 (5)**: 623-628.

JAFFUEL, D.; DEMOLY, P.; GOUGAT, C.; MAUTINO, G.; BOUSQUET, J.; MATHIEU, M. 1999. Rifampicin is not an activator of the glucocorticoid receptor in A549 human alveolar cells. **Molecular pharmacology**, **55 (5)**: 841-846.

JEEVAN, A.; YOSHIMURA, T.; FOSTER, G.; MCMURRAY, D. N. 2002. Effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination on interleukin-1 beta and RANTES mRNA expression in guinea pig cells exposed to attenuated and virulent mycobacteria. **Infection and Immunity**, **70**: 1245-1253.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **The Journal of Immunology**, **171**: 6323–6327.

JUFFERMANS, N. P.; VERBON, A.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN DEUTEKOM, H.; BELISLE, J. T.; ELLIS, M. E.; SPEELMAN, P.; VAN DER POLL, T. 1999. Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. **Infection and Immunity**, **67**: 4295-4297.

JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; KIPNIS, A.; JAMIESON, A.; JUARRERO, M.G.; DIEFENBACH, A.; RAULET, D.H.; TURNER, J.; ORME, I.M. 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. **Journal of Immunology**, **171**(11): 6039-45 .

KAMATH, A. B.; WOODWORTH, J.; XIONG, X.; TAYLOR, C.; WENG, Y.; BEHAR, S. M. 2004. Cytolytic CD8⁺ T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of experimental medicine**, **2004**: 1479–1489.

KARPUS, J.; KENNEDY, K. 1997. MIP-1 and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. **Journal of leukocyte biology**, **62**: 681–687.

KARPUS, J.; LUKACS, N.; KENNEDY, K.; SMITH, W.; HURST, S.; BARRETT, T. 1997. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. **Journal of Immunology**, **158** (9): 4129–4136.

KASAHARA, K.; TOBE, T.; TOMITA, M.; MUKAIDA, N.; SHAO-BO, S.; MATSUSHIMA, K.; YOSHIDA, T.; SUGIHARA, S.; KOBAYASHI, K. 1994. Selective expression of monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein 1 in human blood monocytes by *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of infectious diseases**, **170** (5): 1238-1247.

KAUFMANN, S. H. 2005. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends in Immunology**, **26** (12): 660-667.

KEANE, J.; BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; REMOLD, H. G.; CHUPP, G. L.; MEEK, B. B.; FENTON, M. J.; KORNFELD, H. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infection and Immunity**, **65** (1): 298-304.

KELLER, C.; HOFFMANN, R.; LANG, R.; BRANDAU, S.; HERMANN, C.; EHLERS S. 2006. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. **Infection and Immunity**, **74**: 4295-4309.

KHANNA, M.; SRIVASTAVA, L. M.; KUMAR, P. 2003. Defective interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in pulmonary tuberculosis. **The Journal of communicable diseases**, **35 (2)**: 65-70.

KUNTER, E.; CERRAHOGLU, K.; ILVAN, A.; ISITMANGIL, T.; TURKEN, O.; OKUTAN, O.; KARTALOGLU, Z.; CAVUSLU, S. 2003. The value of pleural fluid anti-A60 IgM in BCG-vaccinated tuberculous pleurisy patients. **Clinical microbiology and infection**, **9(3)**: 212-220.

KURASHIMA, K.; MUKAIDA, N.; FUJIMURA M.; YASUI, M.; NAKAZUMI, Y.; MATSUDA, T.; MATSUSHIMA, K. 1997. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. **American journal of respiratory and critical care medicine**, **155**: 1474-1477.

KWIATKOWSKA, S.; ZIEBA, M.; KUZMINSKA, B. 1999. Concentration of selected cytokines associated with monocytes/macrophages in serum of patients with different clinical stages of pulmonary tuberculosis. **Pneumonologia i alergologia polska**, **67 (11-12)**: 546-553.

KWON, O. J. 1997. The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis. **Journal of Korean medical science**, **12 (6)**: 481-487.

KYD, J. M.; FOXWELL, A. R.; CRIPPS, A. W. 2001. Mucosal immunity in the lung and upper airway. **Vaccine**, **19 (17-19)**: 2527-2533.

LADEL, C. H.; HESS, J.; DAUGELAT, S.; MOMBAERTS, P.; TONEGAWA, S.; KAUFMANN, S. H. 1995. Contribution of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to immunity against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin : studies with T cell receptor-deficient mutant mice. **European journal of immunology**, **25**: 838-846.

LADEL, C. H.; SZALAY, G.; REIDEL, D.; KAUFMANN, S. H. 1997. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. **Infection and Immunity**, **65**: 1936-1938.

LAGRANGE, P. H.; SIMONNEY, N.; HERRMANN, J. L. 2007. New immunological tests in the diagnosis of tuberculosis. **Revue des Maladies Respiratoires**, **24**: 453-472.

LAI, Z. W.; HUNDEIKER, C.; GLEICHMANN, E.; ESSER, C. 1997. Cytokine gene expression profile of circulating CD4+ T cells in active pulmonary tuberculosis. **Chest**, **111 (3)**: 606-611.

LALVANI, A.; BROOKES, R. J.; WILKINSON, A. S.; MALIN, A. A.; PATHAN, P.; ANDERSEN, H.; DOCKRELL, G.; PASVOL.; HILL, A. V. 1998. Human cytolytic and interferon-secreting CD8_ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **95**: 270–275.

LAW, K.; WEIDEN, M.; HARKIN, T.; TCHOU-WONG, K.; CHI, C.; ROM, W. N. 1996. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **153**: 799-804.

LAZAREVIC, V.; FLYNN, J. 2002. CD8_ T cells in tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **166**: 1116–1121.

LAZAREVIC, V.; NOLT, D.; FLYNN, J. L. 2005. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses. **Journal of immunology**, **175**: 1107–1117.

LEE, J. S.; SONG, C. H.; LIM, J. H.; LEE, K. S.; KIM, H. J.; PARK, J. K.; PAIK, T. H.; JUNG, S. S.; JO, E. K. 2003. Monocyte chemotactic protein-1 production in patients with active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy. **Inflammation research**, **52 (7)**: 297-304.

LEE, J. S.; SON, J. W.; JUNG, S. B.; KWON, Y. M.; YANG, C.S .; OH, J. H.; SONG, C. H.; KIM, H. J.; PARK, J. K.; PAIK, T. H.; JO, E. K. 2006. Ex vivo responses for interferon-gamma and proinflammatory cytokine secretion to low-molecular-weight antigen MTB12 of *Mycobacterium tuberculosis* during human tuberculosis. **Scandinavian journal of immunology**, **64 (2)**: 145-154.

LI, L.; SAD, S.; KAGI, D.; MOSMANN, T. R. 1997. CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions. **Journal of immunology**, **158**: 4152–4161.

LIGHTBODY, K. L.; RENSHAW, P. S.; COLLINS, M. L.; WRIGHT, R. L.; HUNT, D. M.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G.; BUXTON, R. S.; WILLIAMSON, R. A.; CARR, M. D. 2004. Characterisation of complex formation between members of the Mycobacterium tuberculosis complex CFP-10/ESAT-6 protein family: towards an understanding of the rules governing complex formation and thereby functional flexibility. **FEMS microbiology letters**, **238 (1)**: 255-262.

LIN, Y.; GONG, J.; ZHANG, M.; XUE, W.; BARNES, D. P. F. 1998. Production of monocyte chemoattractant protein 1 in tuberculosis patients. **Infection and immunity** **66**: 2319-2322.

LIN, M. Y.; GELUK, A.; SMITH, S. G.; STEWART, A. L.; FRIGGEN, A. H.; FRANKEN, K. L.; VERDUYN, M. J.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; VOSKUIL, M. I.; DOCKRELL, H. M.; HUYGEN, K.; OTTENHOFF, T. H.; KLEIN, M. R. 2007. Lack of Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis DosR Regulon Proteins following Mycobacterium bovis BCG Vaccination. **Infection and immunity**, **75(7)**: 3523-3530.

LOETSCHER, M.; GERBER, B.; LOETSCHER, P.; JONES, S. A.; PIALI, L.; LEWIS, I. C.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. 1996. Chemokine receptor specific for IP-10 and MIG: structure, function, and expression in activated T- lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, **184**: 963-969.

LYASHCHENKO, K.; COLANGELI, R.; HOUDE, M.; AL JAHDALI, H.; MENZIES, D.; GENNARO, M. L. 1998. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. **Infection and Immunity**, **66 (8)**: 3936-3940.

MACKAY, C. R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nature immunology**, **2(2)**: 95-101.

MAHAIRAS, G. G.; SABO, P. J.; HICKEY, M. J.; SINGH, D. C.; STOVER, C. K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. **Journal of bacteriology**, **178(5)**: 1274-1282.

MAREI, A.; GHAEMMAGHAMI, A.; RENSHAW, P.; WISELKA, M.; BARER, M.; CARR, M.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. 2005. Superior T cell activation by ESAT-6 as compared with the ESAT-6-CFP-10 complex. **International immunology**, **17 (11)**: 1439-1446.

MASON, C. M.; PORRETTA, E.; ZHANG, P.; NELSON, S. 2007. CD4+ CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine

tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. **Clinical and experimental immunology**, **148 (3)**: 537-545.

MAZZACCARO, R. J.; GEDDE, M.; JENSEN, E. R.; VAN SANTEM, H. M.; PLOEGH, H. L.; ROCK, K. L.; BLOOM, B. R. 1996. 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**, **93**: 11786–11791.

MCHUGH, R.; SHEVACH, E. 2002. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **110 (5)**: 693–702.

MCMURRAY, D. N.; ALEN, S. S.; JEEVAN, A.; LASCO, T.; CHO, H.; SKWOR, T.; YAMAMOTO, T.; MCFARLAND, C.; YOSHIMURA, T. 2005. Vaccine-induced cytokine responses in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, **85**: 295-301.

MCSHANE, H.; PATHAN, A. A.; SANDER, C. R.; KEATING, S. M.; GILBERT, S. C.; HUYGEN, K.; FLETCHER, H. A.; HILL, A. V. 2004. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nature medicine**, **10**: 1240-1244.

MEHER, A. K.; BAL, N. C.; CHARY, K. V.; ARORA, A. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. **The FEBS journal**, **273 (7)**: 1445-1462.

MEHROTRA, J.; BISHAI, W. R. 2001. Regulation of virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. **International journal of medical microbiology**, **291 (2)**: 171-182.

MENAKER, R. J.; JONES, N. L. 2003. Fascination with bacteria-triggered cell death: the significance of Fas-mediated apoptosis during bacterial infection in vivo. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, **5 (12)**: 1149-1158.

MENDEZ-SAMPERIO, P.; VAZQUEZ, A.; AYALA, H. 2003. Infection of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG induces production of CC-chemokines. **The Journal of infection**, **47**: 139-147.

MILLINGTON, K. A.; INNES, J. A.; HACKFORTH, S.; HINKS, T. S.; DEEKS, J. J.; DOSANJH, D. P.; GUYOT-REVOL, V.; GUNATHEESAN, R.; KLENERMAN, P.;

LALVANI, A. 2007. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, **178 (8)**: 5217-5226.

MODLIN, R. L.; REA, T.H.1988. Immunopathology of leprosy granulomas. **Springer seminars in immunopathology**, **10**: 359–374.

MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHARPE, A. H.; ROMANI, L. 2002. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, **169**: 6298–6308.

MUNK, M. E.; GATRILL, A. J.; KAUFMANN, S. H. 1990 Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, **145**: 2434-2439.

MUNK, M. E.; EMOTO, M. 1995. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. **The European respiratory journal. Supplement**, **20**: 668s-675s.

MURPHY, P. M. 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. **Nature immunology**, **2 (2)**:116-122.

MURRAY, P. J.; WANG, L.; ONUFRYK, C.; TEPPER, R. I.; YOUNG, R. A. 1997. T cell derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, **158**: 315–321.

MUSTAFA, A. S. 2002. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. **Molecular Immunology**, **(39)**: 113-119.

MUSTAFA, T.; WIKER, H.G.; MØRKVE, O.; SVILAND, L. 2007. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria: role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response. **Clinical and Experimental Immunology**, **150 (1)**:105-113.

MWANDUMBA, H. C.; SQUIRE, S. B.; WHITE, S. A.; NYIRENDA, M. H.; ZIJLSTRA, E. E.; MOLYNEUX, M. E.; RUSSELL, D. G.; RHOADES, E. R. 2007. Alveolar macrophages from HIV-infected patients with pulmonary tuberculosis retain the capacity to respond to stimulation by lipopolysaccharide. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, **9 (9)**:1053-1060.

NATIONAL TUBERCULOSIS ASSOCIATION. 1961. Classification of Pulmonary Tuberculosis. In: **Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis**: 39-40.

NICOL, M. P.; PIENAAR, D.; WOOD, K.; ELEY, B.; WILKINSON, R. J.; HENDERSON, H.; SMITH, L.; SAMODIEN, S.; BEATTY, D. 2005. Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10, and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring of therapy. **Clinical Infectious Diseases**, **40**: 1301-1308.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. 2004. Immunity to Tuberculosis. **Annual review of immunology**, **22**: 599-623.

OFTUNG, E.; BORKA, E.; MUSTAFA, A. S. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* reactive T cell clones from naturally converted PPD-positive healthy subjects: recognition of the *M. tuberculosis* 16-kDa antigen. **FEMS immunology and medical microbiology**, **20**: 319-325.

OKAMOTO, M.; KAWABE, T.; IWASAKI, I. Y.; HARA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; HASEGAWA, Y.; SHIMOKATA, K. 2005. Evaluation of interferon-gamma, interferon-gamma-inducing cytokines, and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, **145 (2)**: 88-93.

OKAMURA, H.; KASHIWAMURA, S.; TSUTSUI, H.; YOSHIMOTO, T.; NAKANISHI, K. 1998. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. **Current opinion in immunology**, **10**: 259-264.

O'KANE, C. M.; BOYLE, J. J.; HORNCastle, D. E.; ELKINGTON, P. T.; FRIEDLAND, J. S. 2007. Monocyte-dependent fibroblast CXCL8 secretion occurs in tuberculosis and limits survival of mycobacteria within macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, **178 (6)**: 3767-3776.

OLLEROS, M. L.; GULER, R.; VESIN, D.; PARAPANOV, R.; MARCHAL, G.; MARTINEZ-SORIA, E.; CORAZZA, N.; PACHE, J. C.; MUELLER, C.; GARCIA, I. 2005. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-guerin and *Mycobacterium tuberculosis* infections. **The American journal of pathology**, **166 (4)**: 1109-1120.

ONYEBUJOH, P.; ZUMLA, A.; RIBEIRO, I.; Rustomjee, R.; Mwaba, P.; Gomes, M.; Grange, J.M. 2005. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. **Bulletin of the World Health Organization**, **83**: 857-865.

OTTENHOFF, T. H. M.; KUMARARATNC, D.; CASANOVA, J. L. 1998. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology today**, **19**: 491-494.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. 2004. Interferon-assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, **4 (12)**: 761-776.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. 2007. **Tuberculosis 2007: from basic science to patient care**. 1a edition. TuberculosisTextbook.com. 687 p.

PALUDAN, S. R. 1998. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. **Scandinavian journal of immunology**, **48 (5)**: 459-468.

PARK, H. D.; GUINN, K. M.; HARRELL, M. I.; LIAO, R.; VOSKUIL, M. I.; TOMPA, M.; SCHOOLNIK, G. K.; SHERMAN, D. R. 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular microbiology**, **48 (3)**: 833-843.

PATHAN, A. A.; WILKINSON, K. A.; KLENERMAN, P.; MCSHANE, H.; DAVIDSON, R. N.; PASVOL, G.; HILL, A. V.; LALVANI, A. 2001. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, **167**: 5217-5225.

PEARL, J. E.; SAUNDERS, B.; EHLERS, S.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. 2001. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. **Cellular immunology**, **211 (1)**: 43-50.

PETERS, W.; SCOTT, H. M.; CHAMBERS, H. F.; FLYNN, J. L.; CHARO, I. F.; ERNST, J. D. 2001. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **98**: 7958-7963.

PINXTEREN, L. A.; RAVN, P.; AGGER, E. M.; POLLOCK, J.; ANDERSEN, P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, **7 (2)**:155-160.

POLLOCK, J. M.; ANDERSEN, P. 1997. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. **Infection and immunity**, **65 (7)**: 2587-2592.

PORSA, E.; CHENG, L.; GRAVISS, E. A. 2007. Comparison of an ESAT-6/CFP-10 peptide-based enzyme-linked immunospot assay to a tuberculin skin test for screening of a population at moderate risk of contracting tuberculosis. **Clinical and vaccine immunology**, **14 (6)**: 714-719.

PYM, A. S.; BRODIN, P.; BROSCH, R.; HUERRE, M.; COLE, S. T. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium*. **Molecular microbiology**, **46**: 709–717.

PYM, A. S.; BRODIN, P.; BROSCH, R.; HUERRE, M.; COLE, S. T. 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. **Nature medicine**, **9**: 533-539.

RAJA, A.; UMA DEVI, K. R.; RAMALINGAM, B.; BRENNAN, P. J. 2002. Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, **9**: 308-312.

RAJA, A. 2004. Immunology of tuberculosis. **The Indian journal of medical research**, **120**: 213-232.

RAJU, B.; HOSHINO, Y.; BELITSKAYA-LÉVY, I.; DAWSON, R.; RESS, S.; GOLD, J.A.; CONDOS, R.; PINE, R.; BROWN, S.; NOLAN, A.; ROM, W. N.; WEIDEN, M.D. 2007. Gene expression profiles of bronchoalveolar cells in pulmonary TB. **Tuberculosis**, **88 (1)**: 39-51.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. 2001. Immune responses to intracellular bacteria. **Current Opinion in Immunology**, **13 (4)**: 417-428.

RAVN, P.; DEMISSIE, A.; EGUALE, T.; WONDWOSSON, H.; LEIN, D.; AMOUDY, H. A.; MUSTAFA, A. S.; JENSEN, A. K.; HOLM, A.; ROSENKRANDS, I.; OFTUNG, F.; OLOBO, J.; VON REYN, F.; ANDERSEN, P. 1999. Human T cell responses to the

ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of infectious diseases**, **179**: 637-645.

RELJIC, R. 2007. IFN- γ Therapy of Tuberculosis and Related Infections. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, **27 (5)**: 353-364.

RENSHAW, P. S.; PANAGIOTIDOU, P.; WHELAN, A.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G.; WILLIAMSON, R. A.; CARR, M. D. 2002. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. **The Journal of biological chemistry**, **277 (24)**: 21598-21603.

RIBEIRO-RODRIGUES, R.; RESENDE CO, T.; JOHNSON, J. L.; RIBEIRO, F.; PALACI, M.; SA, R. T.; MACIEL, E. L.; PEREIRA, F. E.; DETTONI, V.; TOOSI, Z.; BOOM, W. H.; DIETZE, R.; ELLNER, J. J.; HIRSCH, C. S. 2002. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **9 (4)**: 818-823.

RIEDEL, D. D.; KAUFMANN, S. H. 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. **Infection and Immunity**, **65**: 4620-4623.

RINCO'N, M.; ANGUITA, J.; NAKAMURA, T.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R. A. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. **The Journal of experimental medicine**, **185**: 461-469.

ROOK, G. A.; HERNANDEZ-PANDO, R.; DHEDA, K.; TENG SEAH, G. 2004. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. **Trends in immunology**, **25 (9)**: 483-488.

ROOK, G. A. 2007. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. **Current molecular medicine**, **7 (3)**: 327-337.

ROSENKRANDS, I.; SLAYDEN, R. A.; CRAWFORD, J.; AAGAARD, C.; BARRY, C. E. III; ANDERSEN, P. 2002. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. **Journal of bacteriology**, **184 (13)**: 3485-3491.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **Annual review of immunology**, **22**: 891-928.

ROUPIE, V.; ROMANO, M.; ZHANG, L.; KORF, H.; LIN, M. Y.; FRANKEN, K. L.; OTTENHOFF, T. H.; KLEIN, M. R.; HUYGEN, K. 2007. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. **Infection and Immunity**, **75 (2)**: 941-949.

RUTLEDGE, B. J.; RAYBURN, H.; ROSENBERG, R.; NORTH, R. J.; GLADUE, R. P.; CORLESS, C. L.; ROLLINS, B. J. 1995. High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. **Journal of immunology**, **155 (10)**: 4838-4843.

SADEK, M. I.; SADA, E.; TOOSI, Z.; SCHWANDER, S. K.; RICH, E. A. 1998. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, **19 (3)**: 513-521.

SALGAME, P. 2005. Host innate and th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current opinion in immunology**, **17**: 374-380.

SANCHEZ, F. O.; RODRIGUEZ, J. I.; GARCIA, L. F. 1994 Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. **Infection and Immunity**, **62**: 5673-5678.

SATOGUINA, J.; MEMPEL, M.; LARBI, J.; BADUSCHE, M.; LÖLIGER, C.; ADJEI, O.; GACHELIN, G.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. 2002. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminthic infection (onchocerciasis). **Microbes and infection / Institut Pasteur**, **4**: 1291-1300.

SAUKKONEN, J. J.; BAZYDLO, B.; THOMAS, M.; STRIETER, R. M.; KEANE, J.; KORNFELD, H. 2002. Beta-chemokines are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and inhibit its growth. **Infection and Immunity**, **70(4)**:1684-1693.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. 2000. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infection and Immunity**, **68**: 3322-3326.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. 2002. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. **Cellular Immunology**, **216**: 65–72.

SAUNDERS, B. M.; BRITTON, W. J. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. **Immunology and cell biology**, **85 (2)**: 103-111.

SAUTY, A.; DZIEJMAN, M.; TAHA, R. A.; IAROSI, A. S.; NEOTE, K.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; HAMID, Q.; LUSTER, A. D. 1999. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cell. **Journal of immunology**, **162**: 3549-3558.

SCANGA, C. A.; MOHAN, V. P.; YU, K.; JOSEPH, H.; TANAKA, K.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. 2000. Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon- γ and nitric oxide synthase. **The Journal of experimental medicine**, **192**: 347-358.

SCHALL, T. J.; BACON, K.; TOY, K. J.; GOEDEL, D. V. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **Nature**, **347**: 669–671.

SCHALL, T. J. 1991. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. **Cytokine** **3**:165–183.

SCHAUF, V.; ROM, W. N.; SMITH, K. A.; SAMPAIO, E. P.; MEYN, P. A.; RAMONTANA, J. M.; COHN, Z. A.; KAPLAN, G. 1993. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients **The Journal of infectious diseases**, **168**: 1056-1059.

SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S. C.; DINARELLO, C. A. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, **75**: 40-47.

SCHLUGER, N. W. 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. **Respiratory research**, **2**: 157-163.

SEILER, P.; AICHELE, P.; BANDERMANN, S.; HAUSER, A.E.; LU, B., GERARD, N. P.; GERARD, C.; EHLERS, S.; MOLLENKOPF, H. J.; KAUFMANN, S. H. E. 2003. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is

regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. **European journal of immunology**, **33**: 2676-2686.

SELWYN, P. A.; HARTEL, D.; LEWIS, V. A.; SCHOENBAUM, E. E.; VERMUND, S. H.; KLEIN, R. S.; WALKER, A. T.; FRIEDLAND, G. H. 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. **The New England journal of medicine**, **320**: 545-550.

SHERMAN, D. R.; VOSKUIL, M.; SCHNAPPINGER, D.; LIAO, R.; HARRELL, M. I.; SCHOOLNIK, G. K. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α -crystallin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, **98 (13)**: 7534-7539.

SHIRATSUCHI, H.; JOHNSON, J. L.; ELLNER, J. J. 1991. Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. **Journal of immunology**, **146**: 3165-3170.

SINAN - disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>; consultado em 20/02/2008.

SKWOR, T. A.; SEDBERRY ALLEN, S.; MACKIE, J. T.; RUSSELL, K.; BERGHMAN, L. R.; MCMURRAY, D. N. 2006. BCG vaccination of guinea pigs modulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced CCL5 (RANTES) production in vitro and in vivo. **Tuberculosis**, **86 (6)**: 419-429.

SNAPPER, C. M.; PESCHEL, C.; PAUL, W. E. 1998. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B lymphocytes stimulated with bacterial lipopolysaccharide. **Journal of immunology**, **140**: 2121–2127.

SORENSEN, A. L.; NAGAI, S.; HOUEN, G.; ANDERSEN, P.; ANDERSEN, A. B. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **63**: 1710–1717.

STANDIFORD, T. J.; KUNKEL, S. L.; BASHA, M. A.; CHENSUE, S. W.; LYNCH, J. P.; TOEWS, G. B.; WESTWICK, J.; STRIETER, R. M. 1990. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. **The Journal of Clinical Investigation**, **86 (6)**: 1945-1953.

STEGELMANN, F.; BASTIAN, M.; SWOBODA, K.; BHAT, R.; KIESSLER, V.; KRENSKY, A. M.; ROELLINGHOFF, M.; MODLIN, R. L.; STENGER, S. 2005. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T

cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis* **Journal of immunology**, **175 (11)**: 7474-7483.

STENGER, S.; MAZZACCARO, R.; UYEMURA, K.; CHO, S.; BARNES, P.; ROSAT, J.; SETTE, A.; BRENNER, M.; PORCELLI, S.; BLOOM, B.; MODLIN R. 1997. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. **Science**, **276**: 1684–1687.

STENGER, S.; HANSON, D. A.; TEITELBAUM, R.; DEWAN, P.; NIAZI, K. R.; FROELICH, C. J.; GANZ, T.; THOMA-USZYNSKI, S.; MELIÁN, A.; BOGDAN, C.; PORCELLI, S. A.; BLOOM, B. R.; KRENSKY, A. M.; MODLIN, R. L. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science**, **282**: 121–125.

STENGER, S.; MODLIN, R.L. 1999. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Current opinion in microbiology**, **2**: 89–93.

SUD, D.; BIGBEE, C.; FLYNN, J. L.; KIRSCHNER, D. E. 2006. Contribution of CD8+ T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of immunology**, **176 (7)**: 4296-4314.

TAHA, R. A.; KOTSIMBOS, T. C.; SONG, Y. L.; MENZIES, D.; HAMID, Q. 1997. IFN gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, **155**: 1135-1139.

TAN, B. H.; MEINKEN, C.; BASTIAN, M.; BRUNS, H.; LEGASPI, A.; OCHOA, M. T.; KRUTZIK, S. R.; BLOOM, B. R.; GANZ, T.; MODLIN, R. L.; STENGER, S. 2006. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. **Journal of immunology**, **177**: 1864-1871.

TAUB, D. D.; PROOST, P.; MURPHY, W. J.; ANVER, M.; LONGO, D. L.; VAN DAMME, J.; OPPENHEIM, J. J. 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. **The Journal of clinical investigation**, **95**: 1370-1376.

TAVARES, R. C.; SALGADO, J.; MOREIRA, V. B.; FERREIRA, M. A.; MELLO, F. C.; LEUNG, J. W.; FONSECA L. S.; SPALLEK, R.; SINGH, M.; SAAD, M. H. 2007. Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* in individuals from tuberculosis endemic areas. **Microbiology and immunology**, **51 (3)**: 289-296.

TEITELBAUM, R.; CAMMER, M.; MAITLAND, M.L.; FREITAG, N. E.; CONDEELIS, J.; BLOOM, B. R. 1999. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**: 15190–15195.

TEIXEIRA, H.C.; MUNK, M.E.; KAUFMANN, S.H. 1995. Frequencies of IFN gamma- and IL-4-producing cells during Mycobacterium bovis BCG infection in two genetically susceptible mouse strains: role of alpha/beta T cells and NK1.1 cells. **Immunology Letters**, **46(1-2)**:15-9.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. 2007. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **Jornal brasileiro de pneumologia**, **33 (3)**: 323-334.

TOOSSI, Z.; GOGATE, P.; SHIRATSUCHI, H.; YOUNG, T.; ELLNER, J. J. 1995. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. **Journal of immunology**, **154**: 465–473.

TUFARIELLO, J. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **The Lancet infectious diseases**, **3**: 578–590.

TURNER, J.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; ELLIS, D. L.; BASARABA, R. J.; KIPNIS, A.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. 2002. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. **Journal of immunology**, **169 (11)**: 6343-6351.

ULRICHS, T.; MUNK, M. E.; MOLLENKOPF, H.; BEHR-PERST, S.; COLANGELI, R.; GENNARO, M. L.; KAUFMANN, S. H. 1998. Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. **European journal of immunology**, **28 (12)**: 3949-3958.

VAHLENKAMP, T. W.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. F. 2004. Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells. **Journal of immunology**, **172 (8)**: 4752-4761.

VANHAM, G.; TOOSSI, Z.; HIRSCH, C. S.; WALLIS, R. S.; SCHWANDER, S. K.; RICH, E. A.; ELLNER, J. J. 1997. Examining a paradox in the pathogenesis of

human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. **Tubercle and Lung Disease, 78 (3-4):**145-158.

VANHEYNINGEN, T. K.; COLLINS, H. L.; RUSSELL, D. G. 1997. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. **Journal of immunology, 158 (1):** 330-337.

VANKAYALAPATI, R.; WIZEL, B.; WEIS, S.E.; SAFI, H.; LAKEY, D. L.; MANDELBOIM.; SAMTEN, B.; PORGADOR, A.; BARNES, P. F. 2002 The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. **The Journal of Immunology, 168:** 3451-3457.

VANKAYALAPATI, R.; WIZEL, B.; WEIS, S. E.; KLUCAR, P.; SHAMS, H.; SAMTEN, B.; BARNES, P. F. 2003. Serum cytokine concentrations do not parallel *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine production in patients with tuberculosis. **Clinical infectious diseases, 36:** 24-28.

VANKAYALAPATI, R.; KLUCAR, P.; WIZEL, B.; WEIS, S. E.; SAMTEN, B.; SAGI, H.; SHAMS, H.; BARNES, P. F. 2004. NK Cells Regulate CD8⁺ T Cell Effector Function in Response to an Intracellular Pathogen. **Journal of immunology, 172:** 130-137.

VERBON, A.; JUFFERMANS, N.; VAN DEVENTER, S. J.; SPEELMAN, P.; VAN DEUTEKOM, H.; VAN DER POLL, T. 1999. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. **Clinical and experimental immunology, 115:** 110-113.

VERGNE, I.; CHUA, J.; SINGH, S. B.; DERETIC, V. 2004. Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Annual Review of Cell and Developmental Biology, 20:** 367–394.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; HARRELL, M. I.; DOLGANOV, G. M.; SHERMAN, D. R.; SCHOOLNIK, G. K. 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. **The Journal of experimental medicine, 198(5):** 705-713.

WALKER, K. B.; KEEBLE, J.; COLACO, C. 2007. Mycobacterial heat shock proteins as vaccines - a model of facilitated antigen presentation. **Current Molecular Medicine, 7 (4):** 339-350.

WALLIS, R.S.; AMIR, T. M.; ELLNER, J. J. 1990. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte Western blot. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **87**: 3348–3352.

WALRATH, J.; ZUKOWSKI, L.; KRYWIAK, A.; SILVER, R. F. 2005. Resident Th1-like effector memory cells in pulmonary recall responses to Mycobacterium tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, **(33)** **1**: 48-55.

WANG, C. H.; LIU, C. Y.; LIN, H. C.; YU, C. T.; CHUNG, K. F.; KUO, H. P. 1998. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. **European Respiratory Journal**, **11** **(4)**: 809-815.

WARDS, B. J.; DE LISLE, G. W.; COLLINS, D. M. 2000. An esat6 knockout mutant of Mycobacterium bovis produced by recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. **Tubercle and Lung Disease**, **80**: 185–189.

WILKINSON, R. J.; WILKINSON, K. A.; DE SMET, K. A.; HASLOV, K.; PASVOL, G.; SINGH, M.; SVARCOVA, I.; IVANYI, J. 1998. Human T- and B-cell reactivity to the 16kDa alpha-crystallin protein of Mycobacterium tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, **48** **(4)**: 403-409.

WILKINSON, K. A.; WILKINSON, R. J.; PATHAN, A.; EWER, K.; PRAKASH, M.; KLENERMAN, P.; MASKELL, N.; DAVIES, R.; PASVOL, G.; LALVANI, A. 2005. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, **40**: 184-187.

WILLIAMS, A.; RELJIC, R.; NAYLOR, I.; CLARK, S. O.; FALERO-DIAZ, G.; SINGH, M.; CHALLACOMBE, S.; MARSH, P. D.; IVANYI, J. 2004. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. **Immunology**, **111**: 328-333.

WOLF, A. J.; LINAS, B.; TREVEJO-NUNEZ, G. J.; KINCAID, E.; TAMURA, T.; TAKATSU, K.; ERNST, J. D. 2007. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **Journal of immunology**, **179** **(4)**: 2509-2519

World Health Organization. Core information for the development of immunization policy: 2002 update (WHO/V&B/02.28). Geneva: WHO, 2002.

World Health Organization. The world health report 2004: changing history. Geneva: WHO, 2004.

World Health Organization. 2006, Fact sheet, 104, March 2006.

World Health Organization. 2007. Global Tuberculosis Database
<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp>

WU, H. P.; WU, C. L.; YU, C. C.; LIU, Y. C.; CHUANG, D. Y. 2007a. Efficiency of interleukin-4 expression in patients with tuberculosis and nontubercular pneumonia. **Human Immunology, 68 (10):** 832-838.

WU, B.; HUANG, C.; KATO-MAEDA M; HOPEWELL, P.C.; DALEY, C.L.; KRENSKY, A.M.; CLAYBERGER C. 2007b. Messenger RNA expression of IL-8, FOXP3, and IL-12beta differentiates latent tuberculosis infection from disease. **Journal of Immunology, 178(6):** 3688-3694.

YEW, W. W.; LEUNG, C. C. 2006. Update in tuberculosis 2005. **American Journal of Respiratory and Critical, 173 (5):** 491-498.

YUAN, Y.; CRANE, D. D.; BARRY, C. E 3RD. 1996. Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. **Journal of Bacteriology, 178 (15):** 4484-4492.

ZHANG, Y.; BROSER, M.; COHEN, H.; BODKIN, M.; LAW, K.; REIBMAN, J.; ROM, W. N. 1995. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components. **The Journal of Clinical Investigation, 95 (2):** 586-592.

ZHANG, H.; SHI, C. H.; XUE, Y.; BAI, Y. L.; WANG, L. M.; XU, Z. K. 2006. Immune response and protective efficacy induced by fusion protein ESAT6-CFP10 of M.tuberculosis in mice. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 22 (4):** 443-446. (Abstract)

ZHU, X. W.; FRIEDLAND, J. S. 2006. Multinucleate giant cells and the control of chemokine secretion in response to Mycobacterium tuberculosis **Clinical Immunology, 120:** 10-20.

8 ANEXOS

Artigo submetido:

- Variations in blood chemokines detected by the cytometric bead array during tuberculosis treatment.

Variations in blood chemokines detected by the cytometric bead array
during tuberculosis treatment

Caroline S. Almeida^a, Clarice Abramo^a, Luciano Mazzoccoli^a, Marcos L'Hotellier^b,
Ana Paula Ferreira^a, Henrique C. Teixeira^{a,*}

^a Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences
Institute, Federal University of Juiz de Fora , Minas Gerais, 36036-900, Brasil

^bRespiratory Diseases Division of the Central Public Health Clinic of Juiz de Fora,
Juiz de Fora, Minas Gerais, 36010-040, Brazil

* Corresponding author: Tel/Fax: + 55 32 2102 3214

E-mail: henrique.teixeira@ufjf.edu.br

Summary

Chemokines recruit and activate leukocytes, assisting granuloma formation in tuberculosis. We used the cytometric bead array technique to compare blood chemokines in patients having active tuberculosis (ATB), during treatment (DTB) and after completing treatment (TTB), to levels in BCG-vaccinated healthy controls (HC). The chemokines MIG, IL-8, RANTES, IP-10 and MCP-1 were measured in plasma, serum and in supernatants of PBMC cultures stimulated with the fusion protein ESAT-6/CFP-10 from *Mycobacterium tuberculosis*. MIG, IP-10 and IL-8 were significantly higher in ATB patients in comparison to HC in all sample types, decreasing to HC levels with anti-TB treatment. Plasma and serum levels of MCP-1 and RANTES in ATB patients were similar to those observed in the HC. MCP-1 levels in DTB and TTB patients diminished slightly only in plasma in comparison with ATB. RANTES levels in plasma were significantly lower in DTB and TTB patients in comparison to either HC or ATB, and in PBMC supernatants RANTES levels decreased in TTB patients. In conclusion active TB is associated with increased blood levels of MIG, IP-10 and IL-8, and their decline after treatment may reflect an effect of chemotherapy. The evaluation of blood chemokines may help to monitor response to treatment in tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis; Chemokines; Blood, Treatment, Cytometric bead array

Introduction

Mycobacterium tuberculosis, one of the most important infectious agents, causing 2 to 3 million deaths each year,¹ induces potent chemokine expression.^{2,3} Chemokines are a diverse class of small 8-10 kDa chemotactic molecules acting both as constitutive signals to form secondary lymphoid tissues, and as inducible signals in response to physiological stress, such as bacterial infections.² The mechanisms of immune protection against *M. tuberculosis* are still not totally clear, but it is known that the production of chemokines is involved in chemoattraction and activation of leukocytes, and they also aid in the formation of the granuloma.⁴ Tuberculous granuloma consist of macrophages, dendritic cells, T and B cells, and fibroblasts surrounding cells infected with the bacteria and containing the dissemination and growth of the bacillus in the host.⁵

Monokine induced by interferon-gamma (MIG or CXCL9) and 10kDa protein induced by interferon-gamma (IP-10 or CXCL10) are related chemokines of the CXC subfamily. MIG expression has been detected in peripheral blood mononuclear cells from TB patients after stimulation with the *M. tuberculosis*-specific fusion protein antigen ESAT-6/CFP-10 and may be an interesting marker helpful in assessing downstream responses induced by interferon-gamma (IFN- γ).³ Mice deficient in receptors for MIG and IP-10 (CXCR3) had the granuloma formation altered and delayed when infected with *M. tuberculosis*.⁶ MIG and IP-10 are both induced in monocytes/macrophages, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts and polymorphonuclear neutrophils specifically in response to IFN- α .^{6,7} Those chemokines act to recruit T cells, natural-killer cells (NK) and eosinophils to the site of the inflammation,⁸ inducing cell adhesion to the vascular endothelium via the CXCR3 receptor.^{8,9,10,11}

Interleukin-8 (IL-8) is another important chemokine involved in the micobacteria-host interaction. It is produced primarily by monocytes/macrophages and it recruits neutrophils, T cells and basophils to the site of infection.¹² The production of IL-8 during *M. tuberculosis* infection modulates neutrophil and lymphocyte migration to the granuloma and high levels of IL-8 can be associated with necrotizing granulomas in lung tissue.¹³ IL-8 exogenous levels reduced the survival of *M. tuberculosis* within macrophages, and inhibition of IL-8 has been associated with intracellular mycobacterial proliferation.¹⁴

Monocytes Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) and Regulated on Activation of Normal T cells Expressed and Secreted (RANTES) are involved in the cellular traffic in TB.^{2,15} MCP-1 is produced primarily by monocytes. Besides attracting monocytes,¹⁶ MCP-1 also acts in the traffic of memory T cells and NK cells *in vitro*.¹⁷ Human monocytes infected with *M. tuberculosis* (H37Rv) increased the MCP-1 secretion.¹⁸ RANTES can be produced by alveolar macrophages/monocytes and lymphocytes in *M. tuberculosis* infection,¹² and acts in granuloma formation.¹⁹ RANTES suppressed intracellular growth of *M. tuberculosis* in alveolar macrophages, infected with this bacillus in HIV-positive individuals.²⁰

The knowledge of the production of different chemokines in blood of patients with TB and the effect of anti-TB chemotherapy on the chemokine levels is limited. Chemokine expression has been characterized by conventional techniques such as PCR to assess gene expression and ELISA to detect protein. In this work we used the cytometric bead array (CBA) technique for the simultaneous evaluation of MIG, IP-10, IL-8, RANTES and MCP-1 concentrations in the plasma, serum and in culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with a fusion protein of ESAT-6 and CFP-10, which are two specific immunodominant antigens of

M. tuberculosis.²¹ We analyzed whether blood chemokine production differed between tuberculosis patients and BCG vaccinated healthy controls, evaluating also the effect of anti-TB chemotherapy on blood chemokine levels.

Materials and methods

Population studied

Patients with pulmonary TB were recruited from the Respiratory Diseases Division of the Central Public Health Clinic of Juiz de Fora, Juiz de Fora city, State of Minas Gerais, Brazil. Patients with sputum-positive bacilloscopy or culture-confirmed disease and who had undergone clinical and chest X-ray examinations, were asked to participate in the study and to give a blood sample. AIDS, diabetes, hepatitis, hypertension, pregnancy, and alcoholism were exclusion criteria. For the chemokine analysis in plasma, 23 patients with active TB were chosen before the beginning of anti-TB chemotherapy (active TB or ATB group), 28 receiving the chemotherapy for 1 to 5 months (during treatment or DTB group), and 20 who have completed the six months chemotherapy (treated TB or TTB group). For the chemokine analysis in serum and PBMC culture supernatants ten patients with active TB and ten treated TB patients were studied. Forty BCG-vaccinated health controls (HC) were recruited, 30 of those were used for the plasma analysis, 10 for the serum studies, and 13 for the ESAT-6/CFP-10 stimulated PBMC culture assays. This study was approved by the Medical Ethics committee of the Federal University of Juiz de Fora (No. 174/2006).

Separation of blood components and culture of PBMC

Serum was separated from whole blood. Plasma and PBMC samples were separated by density centrifugation on a Ficoll-Plaque Plus (Amersham Biosciences Uppsala,

Sweden). All samples were stored at -70°C . Plasma samples were thawed, and excess proteins were removed by acid/salt precipitation.²² The supernatants were then adjusted for salt content (0.14 M sodium chloride and 0.01 M sodium phosphate) at pH 7.4, for the determination of chemokine concentrations.

PBMC were resuspended in 10% DMSO in fetal calf serum (FCS; Sigma, St Louis, MO), aliquoted into 1.8 ml tubes (Nunc) and frozen stepwise to -70°C overnight and preserved under liquid nitrogen until assayed. Cryopreserved cells were thawed, washed in medium and adjusted to a concentration of 10^6 cells per ml in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 10 $\mu\text{l/ml}$ non-essential aminoacids and 10% heat-inactivated normal human AB plasma (Hemominas, Juiz de Fora, Brazil). The cells were added to 96 well plates in a volume of 200 μl (2×10^5 cells/well) and incubated in the presence or absence of recombinant ESAT-6/CFP-10 (5 $\mu\text{g/ml}$), for 96 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , in duplicates. The culture supernatants were harvested and stored at -20°C .

Detection of chemokines by Cytometric Bead Array

The cytometric bead array (CBA) technique was performed for the detection of chemokines in plasma and serum samples, and in PBMC culture supernatants using the Human Chemokine-I kit as described by the manufacturer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Briefly, 5 μl of each sample was mixed with 20 μl of diluent G. The mixed samples received 3 μl of each anti-chemokine reagent to mark the presence of MIG, IP-10, IL-8, RANTES and MCP-1. After incubation at room temperature for 1.5 hours, the samples were washed with 500 μl of reagent F and

centrifuged at 1300 rpm for 7 minutes. In each tube supernatants were aspirated with a vacuum pump, leaving approximately 100µl of marked samples. 18µl of discloser (reagent B) was then added to each sample, and the samples were incubated at room temperature for 1.5 hours. After incubation, the samples were centrifuged and aspirated before addition of 100µl of reagent F, which was the last step before acquisition and analysis of standards and samples using the FACScalibur flow cytometer and BD software *CBA Isotype Analysis* (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The positive response to ESAT-6/CFP-10 antigen was obtained by subtracting the unstimulated culture values from those obtained from cultures stimulated with this antigen.

Statistical analysis

Data were compared by Kruskal-Wallis test and differences between groups were assessed using Dunns post-test. For the longitudinal studies before and after TB treatment, the paired Wilcoxon Test was used. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (Mean \pm SEM).

Results

Detection of MIG, IP-10, IL-8, MCP-1 and RANTES in plasma samples of TB patients

Chemokines MIG, IP-10 and IL-8 (Fig. 1A, 1B, 1C) in plasma samples were significantly higher in patients with active TB (MIG = 793.81 ± 206.93 pg/ml; IP-10 = 43.02 ± 8.92 pg/ml; IL-8 = 2.52 ± 0.36 pg/ml) in comparison to the healthy control group (HC), or to the group studied during the TB treatment (DTB), or in comparison to the treated TB group (TTB) ($p < 0.01$). During or after TB chemotherapy levels of MIG (DTB = 293.3 ± 57.02 pg/ml and TTB = 197.7 ± 35.45 pg/ml), IP-10 (DTB = 3.58 ± 1.76 pg/ml and TTB = 3.85 ± 1.94 pg/ml) and IL-8 (DTB = 1.25 ± 0.16 pg/ml and TTB = 1.28 ± 0.15 pg/ml) decreased to levels close to those observed in HC (MIG = 138.77 ± 26.7 pg/ml; IP-10 = 11.16 ± 4.57 pg/ml; IL-8 = 1.49 ± 0.20 pg/ml).

In contrast to MIG, IP-10 and IL-8, levels of RANTES and MCP-1 in plasma of active TB patients (RANTES = 327.66 ± 48.85 ; pg/ml MCP-1 = 5.08 ± 1.22 pg/ml) were similar to those observed in the healthy controls (RANTES = 289.14 ± 33.42 pg/ml; MCP-1 = 3.48 ± 0.36 pg/ml) (Fig. 1D and 1E). During TB treatment and after the completion of 6 months chemotherapy, the plasma levels of RANTES (DTB = 131.7 ± 19.8 pg/ml; TTB = 167.6 ± 34.7 pg/ml) were significantly lower in comparison to either HC or patients with active TB (Fig. 1D). In patients that received TB chemotherapy the levels of MCP-1 (DTB = 2.72 ± 0.29 pg/ml; TTB = 3.12 ± 0.37 pg/ml) decreased slightly in comparison with HC or with ATB (Fig.1E).

Variations in MIG (ATB = 1985 ± 879.3 pg/ml; TTB = 238.8 ± 48.11 pg/ml) , IP-10 (ATB = 26.21 ± 7.55 pg/ml; TTB = 2.44 ± 1.7 pg/ml), IL-8 (ATB = 1.93 ± 0.16

pg/ml; TTB = 1.15 ± 0.21 pg/ml), MCP-1 (ATB = 2.67 ± 0.42 pg/ml; TTB = 3.17 ± 0.38 pg/ml) and RANTES (ATB = 313.6 ± 65.75 pg/ml; TTB = 127.7 ± 43.51 pg/ml) levels before and after treatment were studied in eleven patients from whom plasma samples were collected over time (Fig. 2). Only MCP-1 levels showed no significant difference, when the same group of TB patients were compared before and after treatment (Fig. 2).

Chemokine levels in serum and in PBMC culture supernatants

Since chemokine levels in plasma have generally been shown to be similar during or after anti-TB treatment (Fig. 1), we decided to use only treated patients (TTB but not DTB) in the study of chemokines from serum and from supernatants of PBMC cultures.

The chemokine levels of MIG, IP-10 and IL-8 in serum (Table 1) showed the same pattern observed in plasma. These chemokines were significantly higher in active TB patients in comparison to the HC and TTB groups ($p < 0.05$). Levels of MIG, IP-10 and IL-8 decreased in serum samples after treatment, as they did in the plasma, however they did not decline to the HC levels. Levels of MCP-1 and RANTES in serum were similar in all groups (Table 1).

MIG, IP-10, IL-8 and RANTES levels in supernatants from PBMC cultures stimulated with ESAT-6/CFP-10 of ATB patients were higher in relation to HC and TTB. MCP-1 levels in these cultures, in contrast, were increased in healthy controls in comparison to ATB and TTB groups. The ESAT-6/CFP-10 antigen did not stimulate MCP-1 production in PBMC cultures of TB patients (Table 1).

Discussion

The important findings in this work were that MIG, IP-10 and IL-8 levels detected in plasma, in serum and in ESAT-6/CFP-10 stimulated PBMC cultures from patients with active pulmonary TB were higher in comparison either with BCG vaccinated healthy controls or with TB patients after the completion of anti-TB chemotherapy. Our group showed recently that MIG can be a potent biomarker to access the initial response induced by IFN- γ in TB, because in human PBMC culture the MIG production in active TB patients is higher than in healthy controls after stimulation with ESAT-6/CFP-10.³ The gene expression for MIG was increased in bronchoalveolar lavage cells of active tuberculosis patients that presented the profile of Th1 immune response in comparison to healthy controls.²³ Our data are in agreement with other works, in which high levels of IP-10 were found in plasma of patients with active TB.²⁴ High levels of IP-10 were also detected in serum of patients with TB in relation to healthy individuals and contacts.²⁵ Overexpression of RNAm for IL-8 was observed in human alveolar epithelial A549 cells lineage, after 6 days of infection with *M. tuberculosis*.²⁶ Cell cultures responding to ESAT-6 presented mRNA transcripts for IL-8 in TB patients not observed in healthy controls.²⁷ Significantly higher IL-8 concentration was shown in serum of active pulmonary TB patients in comparison to control individuals.²⁸

Interestingly, our data in plasma, serum and PBMC culture indicate that MIG, IP-10 and IL-8 levels decreased with anti-TB treatment. After two months of TB treatment a decrease of IP-10 was already observed.²⁴ IP-10 and MIG are involved in chemoattracting activated T lymphocytes and amplifying the local cellular immune

response in TB infection. High plasma levels of MIG and IL-8 were reported in patients with active pulmonary TB in comparison with healthy control individuals, and a decrease of those chemokines in plasma was noticed after anti-TB treatment.²² However, the authors did not observe any significant alteration in IP-10 plasma levels of TB patients, after anti-TB treatment or in the control group.²⁹ Ribeiro-Rodrigues *et al.* (2002) showed, through the analysis of chemokines in sputum of TB patients, a decrease in the production of IL-8 already in the second week of treatment, correlating with the decrease of bacilli number in sputum culture. The decrease in IL-8 levels was verified in bronchial alveolar lavage from TB patients after the initiation of treatment.³¹

Various works have shown that the production of cytokines during tuberculosis can decline after treatment. It has been shown that ESAT-6 induced IFN- γ production by T cells in tuberculosis patients decreased after treatment.³² It has also been observed that local and systemic production of IFN- γ can be correlated with production of MIG and IP-10.^{3,33} TNF- α and IL-1 production influence the production of IL-8.¹⁴ Thus the decline in the chemokines measured may be a result of the reduction of pro-inflammatory cytokines due to successful treatment reducing the bacterial load.

In the present work, in the supernatants of PBMC cultures stimulated with ESAT-6/CFP-10 and in plasma samples, the levels of RANTES were increased in active TB patients and decreased with treatment. It is in agreement with the work of Raja (2004), where levels of RANTES decreased after treatment. However, RANTES plasma levels were higher in healthy control individuals than in active TB. RNA_m for RANTES in spleen cells and in macrophages of guinea pigs increased after vaccination with BCG.^{34,35} The BCG vaccination and the frequent exposure to

environmental mycobacteria could in part explain the high RANTES levels in plasma of BCG-vaccinated healthy control individuals from an endemic area of TB in this study.

Higher MCP-1 levels have been shown in serum of patients with active TB in comparison to controls.²⁵ In contrast, our data to MCP-1 levels in serum and plasma did not show statistical difference between the groups studied. This finding is in agreement with other works, in which levels of MCP-1 in serum or in plasma of patients with active TB were not different in comparison to those observed in healthy controls.^{22,36} Our results are also in agreement with the work of Hasan *et al.* (2005) that showed high IL-8 levels, but not increased MCP-1 levels, in patients with active TB (pulmonar and extrapulmonar) in relation to controls from an endemic area. In this study ESAT-6/CFP-10 did not stimulate PBMC from TB patients to produce MCP-1. PBMC of early pulmonary TB patients presented decreased MCP-1 levels in relation to healthy tuberculin reactors individuals and chronic refractory TB patients, when stimulated with PPD or 30kDa *M. tuberculosis* antigen.³⁶ High MCP-1 levels have been correlated in MCP-1 transgenic mice with a higher susceptibility to infection by *Listeria monocytogenes* and *M. tuberculosis*.¹⁷ Genetic studies by Flores-Villanueva *et al.* (2005) indicated that people with high MCP-1 plasma levels show low IL-12 levels in response to *M. tuberculosis* infection, increasing the the likelihood that mycobacterial infection will progress to active pulmonary tuberculosis. We may speculate that the low levels of MCP-1 detected in our TB patients may be associated with a moderate clinical form of the disease, since the presence of pulmonary lesions/cavitations in the TB patients studied was low (data not shown).

The chemokines in serum presented increased levels in relation to the plasma assay. The blood separation for obtaining plasma and serum involves different

processes. In the serum process blood coagulation occurs in which there is platelet degranulation and possible chemokine liberation, and this process has less influence in plasma separation. This can explain in part the high RANTES levels in serum. Platelets act as reservoirs of some chemokines, such as CCL5/RANTES, stored within the granules.³⁸

The concentration of cytokines in serum of TB patients may not reflect their concentration in PBMC cultures stimulated with *M. tuberculosis* antigens.³⁹ However, MIG, IP-10 and IL-8 concentrations in plasma, in serum and in PBMC culture presented similar profiles in the groups we studied. These chemokines were elevated in the active TB pulmonary disease, and decreased to levels similar to the controls after anti-TB treatment. They could be important markers for identifying active TB and for monitoring the treatment. Many elements of the immune system, such as cytokines and chemokines are necessary for a protective response against *M. tuberculosis*. A clear understanding of the induction, functions and modulation of cytokine and chemokine levels are important for advancing TB control.

Acknowledgements

We are grateful for the cooperation of the staff of the Respiratory Diseases Division of the Central Public Health Clinic of Juiz de Fora, for the aid with the tuberculosis patients. We thank Dr. Tom H. E. Ottenhoff for contributing the fusion protein ESAT/6-CFP/10. This work was supported by the CNPq (310912/2006-7), FAPEMIG (CBB 1464) and PQI-CAPES (070).

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Database. 2007
<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp>
2. Algood HMS, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2003;**14**:467-77.
3. Abramo C, Meijgaarden KE, Garcia D, Franken KL, Klein MR, Kolk AJ, Oliveira SC, Ottenhoff TH, Teixeira HC. Monokine induced by interferon gamma and IFN-gamma response to a fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and CFP-10 in Brazilian tuberculosis patients. *Microbes Infect* 2006;**8**:45-51.
4. Murphy PM. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat Immunol* 2001;**2**:116-22.
5. Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* 2005;**17**:374-80.
6. Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hauser AE, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ehlers S, Mollenkopf HJ, Kaufmann SH. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol* 2003;**33**:2676-86.
7. Brice GT, Graber NL, Hoffman SL, Doolan DL. Expression of the chemokine MIG is a sensitive and predictive marker for antigen-specific, genetically restricted IFN-gamma production and IFN-gamma-secreting cells. *J Immunol Methods* 2001;**257**:55-69.
8. Dajotoy T, Andersson P, Bjartell A, Löfdahl C, Tapper H, Egesten A. Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 2004;**76**:685-91.

9. Farber JM. MIG and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997;**61**:246–57.
10. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP-10 and MIG: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;**184**:963-69.
11. Jinquan T, Jing C, Jacobi HH, Reimert CM, Millner A, Quan S, Hansen JB, Dissing S, Malling HJ, Skov PS, Poulsen LK. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J Immunol* 2000;**165**:1548-56.
12. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004;**120**:213-232.
13. Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibman J, Rom WN. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J Clin Invest* 1995;**95**:586-92.
14. O'kane CM, Boyle JJ, Horncastle DE, Elkington PT, Friedland JS. Monocyte-dependent fibroblast CXCL8 secretion occurs in tuberculosis and limits survival of mycobacteria within macrophages. *J Immunol* 2007;**178**: 3767-76.
15. Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* 2001;**104**:99-108.
16. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander SK, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;**19**:513-21.

17. Gu L, Rutledge B, Fiorillo J, Ernst C, Grewal I, Flavell R, Gladue R, Rollins B. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 1997;**62**:577-80.
18. Zhu XW, Friedland JS. Multinucleate giant cells and the control of chemokine secretion in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Immunol* 2006;**120**:10-20.
19. Badewa AP, Quinton LJ, Shellito JE, Mason CM. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis. *Tuberculosis* 2005;**85**:185-95.
20. Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H. Beta-chemokines are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and inhibit its growth. *Infect Immun* 2002;**70**:1684-93.
21. Boesen H, Jensen B N, Wilcke T, Andersen P. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; **63**: 1491-97.
22. Alessandri AL, Souza AL, Oliveira SC, Macedo GC, Teixeira MM, Teixeira AL. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. *Inflamm Res* 2006;**55**:528-33.
23. Raju B, Hoshino Y, Belitskaya-Lévy I, Dawson R, Ress S, Gold JA, Condos R, Pine R, Brown S, Nolan A, Rom WN, Weiden MD. Gene expression profiles of bronchoalveolar cells in pulmonary TB. *Tuberculosis* 2008;**88**:39-51.
24. Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G, Benagiano M, D'Elis MM, Mantovani A, Del Prete G.. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 2005;**7**:1-8.

25. Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, van Deutekom H, Belisle JT, Ellis ME, Speelman P, van der Poll T. Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1999;**67**:4295-97.
26. Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;**66**:1121-26.
27. Ulrichs T, Munk ME, Mollenkopf H, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro ML, Kaufmann SH. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol* 1998;**28**:3949-58.
28. Hasan Z, Zaidi I, Jamil B, Khan MA, Kanji A, Hussain R. Elevated ex vivo monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) in pulmonary as compared with extra-pulmonary tuberculosis. *BMC Immunol* 2005;**6**:14-23.
29. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP 3rd, Toews GB, Westwick J, Strieter RM. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 1990;**86**:1945-53.
30. Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Johnson JL, Ribeiro F, Palaci M, Sá RT, Maciel EL, Pereira Lima FE, Dettoni V, Toossi Z, Boom WH, Dietze R, Ellner JJ, Hirsch CS. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;**9**:818-23.
31. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, Matsushima K. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;**155**:1474-77.
32. Lalvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, Ewer K, Hill AV, Mehta A, Rodrigues C. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded

antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001;**183**:469-77.

33. Bai X, Wilson SE, Chmura K, Feldman NE, Chan ED. Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2004;**84**:375-85.

34. McMurray DN, Allen SS, Jeevan A, Lasco T, Cho H, Skwor T, Yamamoto T, McFarland C, Yoshimura T. Vaccine-induced cytokine responses in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2005;**85**:295-301.

35. Skwor TA, Sedberry Allen S, Mackie JT, Russell K, Berghman LR, McMurray DN. BCG vaccination of guinea pigs modulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced CCL5 (RANTES) production in vitro and in vivo. *Tuberculosis* 2006; **86**:419-29.

36. Lee JS, Song CH, Lim JH, Lee KS, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jung SS, Jo EK. Monocyte chemotactic protein-1 production in patients with active pulmonary tuberculosis and tuberculosis pleurisy. *Inflamm Res* 2003;**52**:297-304,

37. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, Montaña M, Barnes PF, Selman M, Granados J. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 2005;**202**:1649-58.

38. Mueller A, Meiser A, McDonagh EM, Fox JM, Petit SJ, Xanthou G, Williams TJ, Pease JE. CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3. *J Leukoc Biol* 2008; **83**: 875-82.

39. Vankayalapati R, Wize B, Weis SE, Klucar P, Shams H, Samten B, Barnes PF. Serum cytokine concentrations do not parallel *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2003;**36**:24-8.

Table 1: Chemokine levels in serum samples and in PBMC culture supernatant stimulated with ESAT-6/CFP-10 of healthy controls (HC), active TB patients (ATB) and treated TB patients (TTB).

Groups	MIG (pg/ml)^(a)	IP-10 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	RANTES (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
HC (serum)	601.2 ^{(b)(c)} ± 138.7	156.8 ^{(b)(c)} ± 14.7	2.9 ^{(b)(c)} ± 0.14	2291 ± 93.17	23.6 ± 8.5
ATB (serum)	2198 ± 231.7	589.8 ± 124.6	34.6 ± 10.2	2341 ± 82.8	20.2 ± 5.6
TTB (serum)	1134 ^(b) ± 220.6	269.4 ^(b) ± 53.2	10.0 ^(b) ± 3.33	2500 ± 0.00	43.6 ± 14.2
HC (PBMC)	8.9 ^(b) ± 3.08	3.2 ^(b) ± 1.4	48.4 ^(b) ± 21.2	50.7 ^(b) ± 24.0	300.8 ± 145.1
ATB (PBMC)	145.8 ± 106.8	10.0 ± 2.9	313.1 ± 76.2	119.9 ± 38.3	0.0 ^(d) ± 0.0
TTB (PBMC)	19.9 ^(b) ± 7.9	2.9 ^(b) ± 1.6	129.3 ^(b) ± 63.4	21.5 ^(b) ± 14.6	0.9 ^(d) ± 0.9

^(a) Mean ± SEM. ^(b) $p < 0,05$ versus ATB; ^(c) versus TTB, ^(d) versus HC.

Legends

Figure 1: MIG (A), IP-10 (B) , IL-8 (C), RANTES (D) and MCP-1 (E) detected in plasma of patients with active TB (ATB), in patients receiving TB treatment (DTB), in patients after completion of 6 months TB treatment (TTB), and in plasma BCG-vaccinated healthy controls (HC) determined by the cytometric bead array (CBA). * $p < 0.05$.

Figure 2: Longitudinal study of plasma chemokines in TB patients before (ATB) and after the completion of 6 months treatment (TTB). n = 11 for MIG, IP-10 and MCP-1; n = 8 for IL-8 and RANTES. * $p < 0.05$.

Figure 1

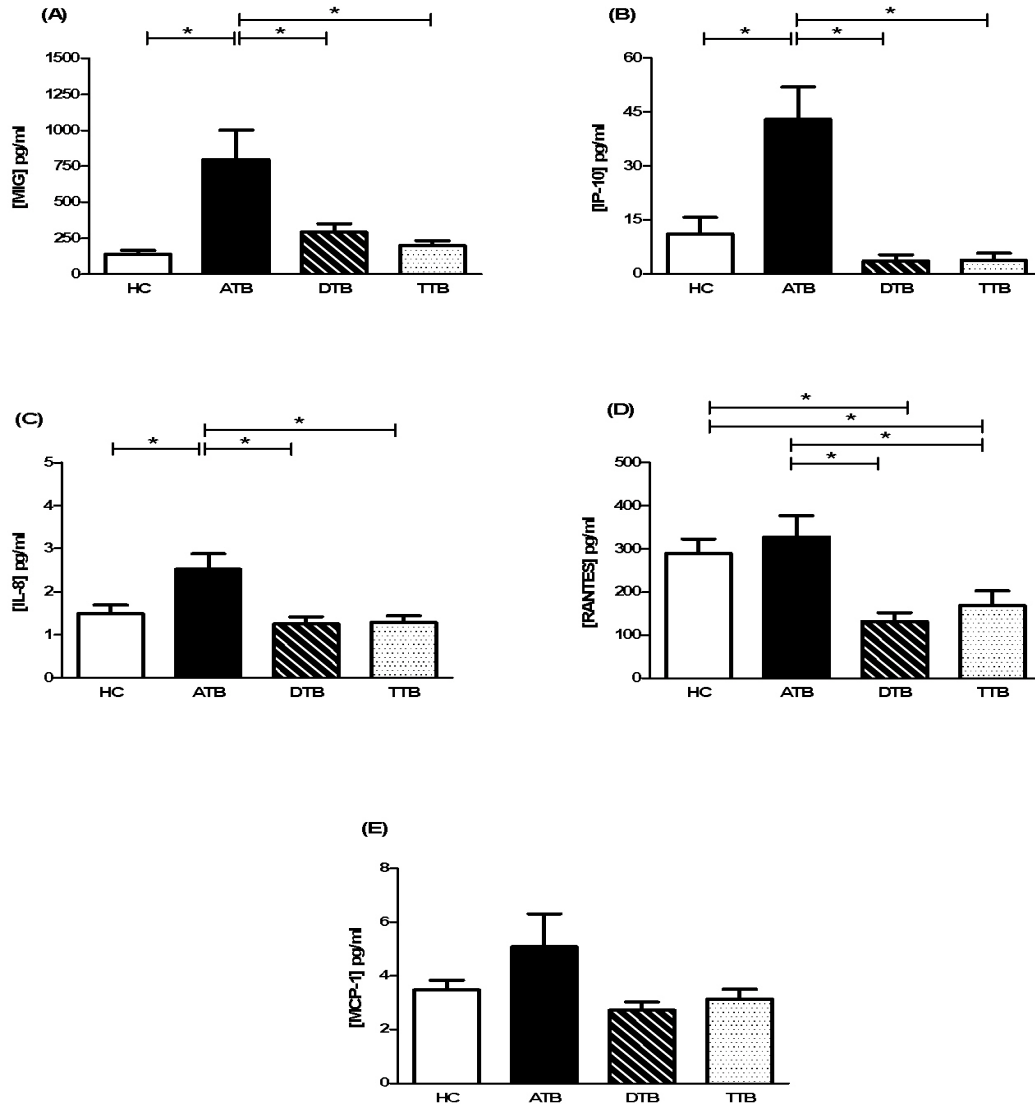


Figure 2

