

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO - PARASITÁRIAS

Ana Márcia Menezes de Mattos

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE FASE ATIVA,
DE FASE LATENTE (DOSR) E DE FASE DE REATIVAÇÃO (RPF) DE
Mycobacterium tuberculosis EM PACIENTES COM TUBERCULOSE
E CONTATOS COM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO LATENTE**

JUIZ DE FORA
2016

ANA MÁRCIA MENEZES DE MATTOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE FASE ATIVA,
DE FASE LATENTE (DOSR) E DE FASE DE REATIVAÇÃO (RPF) DE
Mycobacterium tuberculosis EM PACIENTES COM TUBERCULOSE
E CONTATOS COM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO LATENTE**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora
2016

Mattos, Ana Márcia Menezes.

Avaliação da resposta imune a antígenos de fase ativa, de fase latente (DosR) e de reativação (Rpf) de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose e contatos com diagnóstico de infecção latente / Ana Márcia Menezes Mattos. -- 2016.

124 f. : il.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Tuberculose. 2. Diagnóstico. 3. ESAT-6/CFP-10. 4. DosR. 5. IgG. I. Teixeira, Henrique Couto, orient. II. Título.

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE FASE ATIVA,
DE FASE LATENTE (DOSR) E DE FASE DE REATIVAÇÃO (RPF) DE
Mycobacterium tuberculosis EM PACIENTES COM TUBERCULOSE
E CONTATOS COM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO LATENTE**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

BANCA EXAMINADORA

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

Dr^a. Kelly Aparecida Kanunfre
Universidade de São Paulo

Dr^o. Paulo Renato Zuquim Antas
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a. Clarice Abramo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^o. Dr^o. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Gilza, pelo seus ensinamentos de vida, pela dedicação e cuidado com suas netas enquanto estive ausente e como estive ausente... pelo amor e apoio incondicional. Sem vocês, com certeza nada disso seria possível!

Meus irmãos Wallace e Maryangela pelo apoio, sempre.

Meu afilhado Igor e minha afilhada Lara pelo carinho.

Meu marido Fabrício e minhas filhas, Alice e Júlia, minhas inspirações para toda a vida!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por tornar nossa existência significativa e nos conceder a oportunidade de evoluir;

A minha família, que não poupou esforços para me apoiar incondicionalmente, compreendendo cada minuto que me foi tirado deles para a realização dessa tese;

Ao meu orientador professor doutor Henrique Couto Teixeira que me concedeu essa oportunidade, acreditou em meu trabalho e muito me surpreendeu com sua amizade e paciência mediante os obstáculos a serem vencidos durante o desenvolvimento desse trabalho. Nas minhas idas e vindas, da Iniciação científica, mestrado e doutorado, somamos mais de dez anos de convivência e respeito. Obrigada!

Em particular às minhas amigas e companheiras de bancada, Carol e Lily. Foi um grande prazer tê-las no meu dia-a-dia de laboratório, momentos inesquecíveis de alegrias e angústias. Mais alegrias, claro!

Ao meu amigo Alexandre, grande incentivador da minha independência nas coletas de sangue, além de parceiro para todos os momentos no laboratório.

À minha prima Mayara, por disponibilizar seu tempo para me ajudar nas coletas de sangue. A enfermeira do centro de tratamento de tuberculose, Talita, que se tornou grande amiga. Também meu obrigado, por me ajudar nas coletas de sangue e ser uma grande incentivadora do desenvolvimento da pesquisa junto aos pacientes.

Às pessoas queridas de minha família, grandes incentivadoras de meu esforço Fábio Motta, Meire, Mayra, minhas tias Dilza, Nilceia e Maria e tios Antônio Martins e Antônio Menezes.

Às pessoas queridas do laboratório de imunologia Bárbara, Flávia, Érick, Ana Cláudia, Alessa, que de formas diferentes enriqueceram meu dia-a-dia no laboratório.

À Carolina van Keulen e Isabela, companheiras de luta. Obrigada pelo carinho e pela paciência nos dias de experimento.

À doutora Márcia por, gentilmente, conceder minha permanência no centro de tratamento de tuberculose e realizar minhas coletas de sangue.

Ao Dr. Erick pelo apoio, junto aos pacientes, nas coletas feitas no Hospital Universitário.

Aos professores do laboratório de Imunologia: Prof^a Ana Paula, Prof^a Jacy, Prof^o Gilson e Prof^a Juciane pelo grande incentivo.

À pessoas especiais e dedicadas que nos dão o suporte para a realização de nossos experimentos. Leidiana e Sirlei, sem vocês tudo seria mais difícil.

À todos aqueles que gentilmente doaram suas amostras sanguíneas para a 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

A tuberculose (TB) permanece como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A identificação de novos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* e de biomarcadores de infecção, capazes de auxiliar no diagnóstico da doença ativa e da infecção latente são metas importantes para o controle da TB. No presente trabalho foram estudados pacientes TB antes e após receberem o tratamento, e indivíduos contatos TB com diagnóstico de infecção latente (PPD+). Foram investigados os níveis séricos de IgG e IgG1 e a produção de citocinas e quimiocinas contra os seguintes antígenos: 1) antígenos da fase de infecção ativa (ESAT-6/CFP-10, Rv0717 e Rv3353); 2) infecção latente ou DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv1737); e, 3) antígenos da fase de reativação da infecção ou Rpf (Rv0867 e Rv2389). A produção de IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e IL-4 foi avaliada em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com antígenos do *M. tuberculosis*, através de ELISA e/ou CBA-citometria. Níveis séricos de CCL-2, CXCL-8, CXCL-9 e CXCL-10 foram mensurados em pacientes TB e controles. Nossos resultados mostram níveis séricos elevados de anticorpos IgG1 contra ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2029, Rv2628 e Rv0867 em pacientes com TB ativa em comparação ao grupo controle ($p < 0.001$). Após completada a quimioterapia, a resposta de IgG1 frente aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv3353, Rv2628, Rv2029, e Rv0867 foi reduzida a níveis de controle ($p < 0,01$). A análise da curva ROC confirmou o bom desempenho dos antígenos Rv0717, Rv1733, Rv3353, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 no diagnóstico da TB. Interessantemente, Rv0717 e Rv1733 induziram um pico de resposta de IgG1 após 1-3 meses de quimioterapia ($p < 0,01$). Neste grupo de pacientes (1-3M), uma alta produção de IFN- γ e TNF- α foi observada após estimulação de PBMC com ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029. Os grupos não diferiram na produção de IL-17, IL-10 e IL-4, indicando uma predominante resposta com perfil Th1 nos pacientes estudados. Níveis elevados de CXCL-8, CXCL-9 e CXCL-10 foram detectados no soro de pacientes com TB ativa. Após 6 meses de tratamento os níveis séricos de CXCL-9 e CXCL-10 foram reduzidos a níveis de controle. Níveis séricos elevados de anticorpos IgG e IgG1 específicos para os antígenos ESAT-6/CFP-10 e Rv1733 foram observados em pacientes com TB ativa e em contatos TB, em comparação com o

grupo controle ($p < 0,05$). De forma semelhante, pacientes TB e contatos TB também não diferiram quanto a produção de IFN- γ em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10, indicando haver dificuldade em diferenciar pacientes com TB ativa de indivíduos com TB latente. Interessantemente, em resposta ao antígeno DosR Rv1733, níveis elevados de IFN- γ foram observados nas culturas de PBMC dos contatos TB, em comparação aos grupos TB ativa e controle sadio ($p < 0,05$). Em conjunto, esses resultados sugerem a existência de biomarcadores da tuberculose, representados por: 1) detecção de níveis elevados de anticorpos IgG1 contra ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867; 2) alta produção de IFN- γ e TNF- α em resposta a diferentes antígenos do *M. tuberculosis*; e, 3) níveis séricos aumentados de CXCL-9 e CXCL-10. Esse perfil de resposta imune pode auxiliar no diagnóstico da TB e no monitoramento do tratamento. Além disso, a detecção de níveis elevados de IFN- γ em resposta ao antígeno Rv1733 pode contribuir no diagnóstico da doença em contatos TB que apresentam tuberculose assintomática.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose; Diagnóstico; ESAT-6/CFP-10; DosR, IgG, IFN- γ .

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a major public health problem in the world. The identification of new *Mycobacterium tuberculosis* antigens and infection biomarkers capable of assisting in the diagnosis of active disease and latent infection are important targets for TB control. In the present study, TB patients before and after receiving treatment and contacts TB diagnosed with latent infection (PPD +), were studied. We investigated the levels of serum IgG and IgG1 and the production of cytokines and chemokines against the following antigens: 1) antigens from the active phase of infection (ESAT-6/CFP-10, Rv0717 and Rv3353); 2) latent infection antigens or DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029 and Rv1737); and 3) antigens from the reactivation phase of infection or Rpf (Rv0867 and Rv2389). The production of IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 and IL-4 was evaluated in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures stimulated with *M. tuberculosis* antigens, by using ELISA and/or CBA-cytometry. Serum levels of CCL-2, CXCL-8, CXCL-9 and CXCL-10 were measured in TB patients and controls. Our results show elevated serum levels of IgG1 antibodies against ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 and Rv0867 in patients with active TB, in comparison with the control group ($p < 0.001$). After completion of the chemotherapy, the IgG1 response to ESAT-6/CFP-10, Rv3353, Rv2628, Rv2029 and Rv0867 was reduced to control levels ($p < 0.01$). The ROC curve analysis confirmed the good performance of Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 and Rv0867, and antigens in the diagnosis of TB. Interestingly, Rv0717 and Rv1733 induced an IgG1 peak response after 1-3 months of chemotherapy ($p < 0.01$). In this patient group (1-3m), a high IFN- γ and TNF- α response was observed after stimulation of PBMC with ESAT-6/CFP-10, Rv1733 and Rv2029. The groups did not differ in IL-17, IL-10 and IL-4, indicating a predominant Th1 response in the patients studied. High levels of CXCL-8, CXCL-9 and CXCL-10 were detected in the serum of patients with active TB. After 6 months of treatment, levels of both CXCL-9 and CXCL-10 were reduced to control levels. Elevated serum levels of IgG and IgG1 specific for both ESAT-6/CFP-10 and Rv1733 were observed in patients with active TB and in TB contacts, in comparison with the control group ($p < 0.05$). Similarly, TB patients and TB contacts also did not differ in the production of IFN- γ in response to ESAT-6/CFP-10, indicating that the

discrimination between patients with active TB and individuals with latent TB is difficult. Interestingly, in response to the DosR Rv1733 antigen, high levels of IFN- γ were observed in PBMC cultures of TB contacts in comparison to both active TB and healthy control groups ($p < 0.05$). Together, these results suggest the existence of tuberculosis biomarkers represented by: 1) elevated serum levels of IgG1 antibodies against ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 and Rv0867; 2) high IFN- γ and TNF- α production in response to different *M. tuberculosis* antigens; and 3) increased serum levels of CXCL-9 and CXCL-10. This profile of immune response may assist in the diagnosis of TB and monitoring drug therapy. Furthermore, detection of high levels of IFN- γ in response to the Rv1733 antigen may contribute to the diagnosis of TB disease in contacts presenting asymptomatic tuberculosis.

KEYWORDS: Tuberculosis; Diagnosis; ESAT-6/CFP-10; DosR; IgG; IFN- γ .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Perfil da patogenia desencadeada pela infecção do <i>M. tuberculosis</i>	25
Figura 2 - Níveis séricos de anticorpos IgG1 contra antígenos do <i>M. tuberculosis</i> ...	60
Figura 3 - Comparação de antígenos do <i>M. tuberculosis</i> através da análise da curva ROC utilizando soro de pacientes com TB ativa.	62
Figura 4 - Comparação de antígenos do <i>M. tuberculosis</i> através da análise da curva ROC utilizando soro de pacientes com 1-3 meses de tratamento.	63
Figura 5 - Níveis séricos de anticorpos IgG contra os antígenos de fase ativa e antígenos de fase de latência no soro de contatos TB com infecção latente.....	68
Figura 6 - Níveis séricos de anticorpos IgG1 contra os antígenos de fase ativa e antígenos de fase de latência no soro de contatos TB com infecção latente.....	70
Figura 7 - Avaliação da produção de IFN- γ por PBMC em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029.....	72
Figura 8 - Avaliação da produção de CXCL-10 por PBMC em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029.....	72
Figura 9 - Produção de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-17 (C), IL-10 (D) e IL-4 (E) por PBMC após estimulação com ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029.	74
Figura 10 - Níveis séricos de CXCL-10 (A), CXCL-9 (B), CXCL-8 (C), CCL-2 (D) e IFN- γ (E) em pacientes com tuberculose e contatos TB.	76
Figura 11 - Níveis séricos de CXCL-10 (A), CXCL-9 (B), CXCL-8 (C) e CCL-2 (D) em pacientes TB antes e após completado o tratamento.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características gerais dos pacientes com TB pulmonar e controles sadio da primeira etapa do projeto.....	48
Tabela 2- Dados clínicos e demográficos e tempo de tratamento dos pacientes com TB pulmonar ativa.....	49
Tabela 3- Características gerais de indivíduos contatos de pacientes TB ativos diagnosticados com infecção latente (LTBI).	51
Tabela 4 - Características gerais dos indivíduos controles sadios.	52
Tabela 5 - Sensibilidade e especificidade dos antígenos do <i>M. tuberculosis</i> expressos na fase ativa, antígenos de latência e antígenos de reativação no sorodiagnóstico da tuberculose.....	65
Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade dos antígenos expressos na fase ativa, antígenos de latência e antígenos de reativação no sorodiagnóstico da tuberculose após 1-3 meses de tratamento.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS/SIDA	“Acquired immunodeficiency syndrome” / Síndrome da imunodeficiência adquirida
ASC	Área sob a curva
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BSA	“Bovine serum albumin” / Albumina sérica bovina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CR	“Complement receptor” / Receptor do complemento
CD	“Clusters of differentiation” / moléculas expressas na superfície de leucócitos
CFP-10	“Culture filtrate antigen” / Antígeno de filtrado de cultura
CFU	“Colony-forming units” / Unidades formadoras de colônias
DNA	“Deoxyribonucleic acid” / Ácido desoxiribonucléico
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay” / Ensaio de absorção Imunoenzimático
ELISPOT	“Enzyme linked immunospot assay” / Ensaio imunoenzimático de formação de spots
ESAT-6	“Early secreted antigenic target -6” / Alvo antigênico precocemente secretado de 6 kDa
Fc	Fragmento cristalizável
HBHA	“Heparin binding hemagglutinin adhesin” / Adesina hemaglutinina que liga heparina
HIV	“Human immunodeficiency virus” / Vírus da imunodeficiência humana
HLA	“Human leukocyte antigen” / Antígeno leucocitário humano
IE	“ELISA index” / Índice ELISA
IFN- γ	“Gamma-interferon” / Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	“Interleukines” / Interleucinas
kDa	Kilo-Dalton
LAM	Liporabinomanana
mAb _s	“Monoclonal antibodies” / Anticorpos monoclonais
MDR	“Multi-drug resistance” / multi-drogas resistente
MHC	“Major histocompatibility complex” / Complexo principal de histocompatibilidade
NK	“Natural Killers Cells” / Células matadoras naturais
nm	Nanômetro

NO	“Nitric oxide” / Óxido nítrico
NRAMP1	“Natural Resistance Associated macrophage Protein” / Proteína associada à resistência natural de macrófagos
NTM	Micobactérias não tuberculosas
OPD	“o-Phenylenediamine” / Orto-fenilenodiamina
PBS	“Phosphate buffered saline” / Salina tamponada com fosfato
PPD	“Purified Protein Derivative of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ” / Derivado proteico purificado do <i>M. tuberculosis</i>
RV	“Likelihood ratio” / Razão de verossimilhança
RD	Região de diferença
ROC	“Receiver operator characteristic curve” / Curva característica de operação do receptor
TAPs	Proteínas transportadoras de antígenos
TB	Tuberculose
TCR	“T-cell receptor” / Receptor da células T
TGF- β	“Transforming growth factor beta” / Fator de transformação do crescimento-beta
Th	“T helper” / T auxiliar
TLR _s	“Toll-like receptors” / Receptores do tipo “Toll”
TNF- α	“Tumor necrosis factor-alpha” / Fator de necrose tumoral alfa
Treg	“Regulatory T cells” / Células T regulatórias
UT	Unidades de tuberculina
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Epidemiologia	18
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.3 Aspectos clínicos da infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
1.4 Aspectos básicos do granuloma na infecção por <i>M. tuberculosis</i>	22
1.5 Aspectos imunológicos da infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
1.5.1 Imunidade inata.....	25
1.5.2 Imunidade adaptativa	28
1.5.3 Da infecção latente à reativação da TB	32
1.5.4 Imunidade humoral frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
1.6 Diagnóstico da tuberculose.....	36
1.7 Tratamento	38
1.8 Antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 Pacientes	46
3.2 Coleta de sangue, separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), e obtenção de amostras de soro de pacientes TB, contatos TB e controles.	53
3.3 Antígenos.....	53
3.4 Avaliação da resposta humoral.....	54
3.5 Culturas de PBMC estimuladas com antígenos do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
3.6 ELISA para detecção de IFN- γ	55
3.7 ELISA para detecção de CXCL-10	56
3.8 Detecção da produção de citocinas e quimiocinas pelo método CBA	56

3.9 Receiver Operating Characteristic Curve - Curva ROC	57
3.10 Análise estatística	58
4 RESULTADOS	59
4.1 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 de pacientes com tuberculose frente a diferentes antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , influência do tratamento quimioterápico.	59
4.2 Análise das curvas ROC para os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1737, Rv0867 e Rv2389 empregados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) no diagnóstico da tuberculose.	61
4.3 Sensibilidade e especificidade de antígenos das fases de latência (DosR), reativação e de fase ativa da infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> no diagnóstico da tuberculose.	64
4.4 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG de pacientes com tuberculose ativa, contatos de pacientes TB e controles sadios, frente a antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	67
4.5 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 de pacientes com tuberculose ativa, contatos TB e controles sadios frente a antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	69
4.6 Produção de IFN- γ e CXCL-10 em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029 em pacientes com TB ativa comparado com indivíduos contatos TB com diagnóstico de infecção latente.	71
4.7 Produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após estimulação com os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029, em pacientes com tuberculose em diferentes etapas do tratamento quimioterápico...	73
4.8 Níveis de quimiocinas e IFN- γ no soro de pacientes com TB ativa em diferentes etapas do tratamento e em contatos TB com diagnóstico de infecção latente.	75
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	89
7 REFERÊNCIAS.....	90
ANEXO.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A tuberculose permanece como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo a segunda principal causa de mortes por doenças infecciosas depois da síndrome da imunodeficiência adquirida, com aproximadamente, 1,5 milhões de óbitos notificados no ano de 2014 (Who, 2015). Em 1993, a TB passou a ser reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma emergência global, sendo inserida nas políticas de saúde internacionais, havendo uma meta de reduzir e parar o coeficiente de incidência da doença até 2015 (Who, 2002). Com esse objetivo no ano de 2006, a OMS divulgou a Estratégia Stop TB que visava reduzir em 50%, até 2015, os coeficientes de prevalência e de mortalidade em relação ao ano de 1990. Desde então, a partir das estratégias expostas pela OMS, o panorama mundial da TB vem melhorando. O diagnóstico eficaz associado ao tratamento da doença salvaram, no mundo, 43 milhões de vidas no período de 2000 a 2014 e, em 2015, a prevalência estimada para TB foi 42% menor que em 1990 (Who, 2015). Apesar disso, a doença ainda se configura como uma emergência global. Em 2014 o número de casos novos no mundo foi estimado em 9,6 milhões, sendo que a maior parte está concentrada nas regiões da Ásia e da África, com uma proporção de 58% e 28% dos casos, respectivamente. Além disso, 80% dos casos estão concentrados em 22 países. Dentre estes, seis se destacam por apresentar as maiores incidências e prevalências de TB no mundo: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul. O Brasil ocupa a 18ª posição, entre esses países, com uma representatividade de 0,9% de casos de TB no mundo (Who, 2015).

Somente 5-15% dos indivíduos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* progridem para o desenvolvimento da doença ativa (Who, 2015). Aproximadamente um terço da população mundial, ou mais de 2 bilhões de pessoas, apresentam a infecção latente pelo *M. tuberculosis*, com a possibilidade de reativação e transmissão da doença (Who, 2012; Kizza *et al.*, 2015). Assim, uma importante política de saúde pública, que vem sendo utilizada no controle da TB em países de alta renda, mas ainda em fase de implementação nos países de baixa e média renda (Kizza *et al.*, 2015), é a investigação de indivíduos que convivem com pacientes com tuberculose

ativa, denominados contatos TB. Neste contexto, em termos de prevalência, dos 28,1% contatos em países de alta renda que apresentaram a infecção latente apenas 1,4% desenvolveram a doença ativa. Enquanto que, em países de baixa e média renda dos 51,5% contatos que apresentaram infecção latente, 3,1 % desenvolveram a forma ativa da doença (Fox *et al.*, 2013).

No Brasil, a incidência de TB também reduziu nos últimos anos, segundo os números divulgados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2014). Em 2013, o Brasil diagnosticou 71.123 casos novos de TB, perfazendo um coeficiente de incidência de 35,4/100.000 habitantes. Esse coeficiente em 2003 era de 44,4/100.000 habitantes, havendo uma redução de 20,4% em comparação a 2013. Quando analisadas as regiões do Brasil, em 2013, verificou-se que o Norte, o Sudeste e o Nordeste apresentaram os mais altos coeficientes de incidência: 45,2, 37,1 e 34,7/100.000 habitantes, respectivamente. Do total de casos novos diagnosticados, 85,7% apresentaram a forma clínica pulmonar e, destes, 65,2% eram bacilíferos (Saúde, 2014).

Com o surgimento, em 1981, da AIDS, observou-se, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, crescente número de casos notificados de tuberculose em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. Esta associação (HIV/TB) ainda representa um sério problema de saúde pública, causando aumento da morbidade e mortalidade pela tuberculose em muitos países (Saúde., 2007). A infecção com o vírus HIV contribui para o aumento da incidência da TB no mundo, uma vez que, pacientes com HIV apresentam maior risco da infecção latente progredir para doença ativa e transmitir a infecção a outras pessoas (Morens *et al.*, 2004; Latorre e Dominguez, 2015). Em 2012, dos 8,6 milhões de casos de TB notificados no mundo, 1,3 milhões de casos, que representam 13% da população com TB, apresentaram coinfeção com HIV (Who, 2013).

Outro grande problema que reforça a gravidade da TB no mundo é o aumento do número de pacientes com tuberculose multi-drogas resistente (TB-MDR). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2012 os casos estimados de TB-MDR foram de 3,6% dos casos novos de TB e 20,2% referentes aos casos já previamente tratados. Estas estimativas estão essencialmente inalteradas desde 2011 (Who, 2013). Estes dados mostram a importância do diagnóstico precoce e tratamento efetivo, bem como de estratégias de prevenção e controle para a tuberculose.

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Os membros do gênero *Mycobacterium* se caracterizam por apresentar um envelope celular muito complexo, que é notável pela baixa permeabilidade das suas células, por conter em sua parede celular ácidos graxos de cadeias longas α -alquil, β -hidroxil. Tal característica confere a estes microrganismos uma coloração diferenciada que é conhecida como técnica de *Ziehl-Neelsen* (FORRELAND *et al.*, 2013).

O *Mycobacterium tuberculosis* é a espécie mais importante do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* que se refere ao grupo de espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*, que são geneticamente muito similares, com cerca de 99,9% de identidade a nível de nucleotídeos, além disso, apresentam sequência idêntica de rRNA 16s (BROSH, *et al.*, 2002; FORRELAND *et al.*, 2013). As bactérias do complexo *M. tuberculosis* são classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento; seu tempo de geração é longo podendo variar de 14 a 20 dias dependendo do meio de cultura empregado para o seu crescimento. Essas micobactérias podem ficar em estado de dormência por longos períodos, fator responsável pela reativação da infecção (Saúde/Funasa, 2002). Além destas características, uma peculiaridade importante das cepas virulentas do complexo *M. tuberculosis* é o agrupamento dos bacilos formando ramos alongados e tortuosos, conhecidos como fator corda ou crescimento em corda (Coelho *et al.*, 2007)

As micobactérias são bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo de 0,2 a 0,6 μm de diâmetro e 1 a 10 μm de comprimento (Saúde/Funasa, 2002). Com base nos critérios clínicos, as micobactérias podem ser divididas em três grupos. O primeiro grupo inclui os patógenos típicos ou estritos ao homem e alguns animais, dentre eles os membros do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis* e *M. lepraemurium*. Estes patógenos geralmente não são encontrados no meio ambiente (Portaels, 1995). O segundo grupo consiste de micobactérias potencialmente patogênicas. A maioria é encontrada em todos os lugares na natureza e podem tornar-se patogênicas em circunstâncias especiais, como em indivíduos imunocomprometidos. Este grupo é representado por bactérias do complexo *M. avium-intracellulare* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* e *M. intracellulare*), patógenos oportunistas capazes de

causar doença tanto no homem como no animal. O terceiro grupo consiste normalmente de espécies saprofíticas, não patogênicas ou excepcionalmente patogênicas (Portaels, 1995).

1.3 Aspectos clínicos da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose pode ser transmitida através da inalação de partículas contendo o *M. tuberculosis* (Sepkowitz *et al.*, 1995). Calcula-se que durante um ano, em uma comunidade, uma fonte de infecção poderá infectar, em média, 10 a 15 pessoas que com ela tenham tido contato (Saúde/Funasa, 2002)

As lesões apresentadas na TB são muito complexas com diferentes características patológicas, microbiológica e imunológicas que evoluem, muitas vezes, ao longo de um período que leva meses, ou até mesmo anos, antes do aparecimento de sintomas e diagnóstico da doença (Lenaerts *et al.*, 2015). Tal complexidade é observada, também, nas diversas formas de manifestação da infecção. Alguns indivíduos bastante expostos ao *M. tuberculosis* podem passar toda a vida sem nenhum sinal da doença, mesmo apresentando evidências imunológicas da infecção, sendo considerados portadores de infecção latente. Já entre aqueles que desenvolvem a doença ativa, encontram-se os que apresentam a doença “primária”, e os que expressam a doença “pós-primária ou secundária”. A doença “primária” progride rapidamente após a exposição ao bacilo, ocorrendo em uma pequena porcentagem de pacientes, típico em indivíduos com alguma condição subjacente de deficiência do estado imunológico. A doença “pós-primária” ocorre anos ou décadas mais tarde, também desencadeada por alguma alteração do estado imunológico do paciente (Lenaerts *et al.*, 2015).

A doença primária evolui a partir do foco pulmonar (processo pneumônico parenquimatoso) ou, com maior frequência, do foco ganglionar. Esses gânglios podem fistulizar-se para um brônquio adjacente e determinar a disseminação broncogênica da tuberculose. Com a expansão das lesões destrutivas, os bacilos atingem os vasos sanguíneos e disseminam-se nos pulmões, podendo também atingir outros órgãos (Bombarda *et al.*, 2001). Quando ocorre disseminação por via hematogênica para cérebro, rins, vértebras, linfonodos e região apical dos pulmões, a doença, evolui para o quadro de tuberculose primária progressiva, tuberculose miliar ou tuberculose

disseminada (Saúde/Funasa, 2000), que é característico na doença primária (Lenaerts *et al.*, 2015).

A tuberculose pós-primária ou secundária é considerada uma reativação de lesões prévias de bacilos dormentes e causa uma infecção granulomatosa crônica. Frequentemente essa reativação está relacionada com períodos de imunodepressão (Lenaerts *et al.*, 2015). Histologicamente a tuberculose secundária é caracterizada por presença de necrose caseosa que produz lesões localizadas (Andreu *et al.*, 2004), mas que inclui um amplo espectro de patologias. Por exemplo, alguns pacientes desenvolvem grandes cavidades cheias de ar (normalmente apenas uma minoria), enquanto outros desenvolvem apenas nódulos solitários no parênquima pulmonar, ou podem apresentar infecção limitada no sistema linfático ou em outros sítios extrapulmonares (Lenaerts *et al.*, 2015).

1.4 Aspectos básicos do granuloma na infecção por *M. tuberculosis*

Durante o processo de infecção, várias células pertencentes ao sistema imunológico são recrutadas, culminando na formação de estruturas organizadas denominadas granuloma (Cosma *et al.*, 2003). O granuloma, durante a infecção, tem como função conter os bacilos fisicamente, impedindo sua disseminação, além de fornecer um microambiente imunológico que, em parte, ajuda a inibir o crescimento do bacilo, através da ativação dos mecanismos bactericidas dos macrófagos, além de ser um ambiente de privação de nutrientes e oxigênio para o *M. tuberculosis* (Algood *et al.*, 2003; Korb *et al.*, 2016). O granuloma inicial é composto por um núcleo de macrófagos infectados cercado por macrófagos adicionais exibindo uma morfologia distinta, incluindo as células gigantes multinucleadas, células epitelioides, macrófagos espumosos (Peyron *et al.*, 2008), além dos granulócitos e monócitos (Ulrichs e Kaufmann, 2006; Russell, 2007). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, o nódulo sofre marcada neovascularização, o que denota um extenso recrutamento de linfócitos, macrófagos e células dendríticas para o sítio de infecção (Alatas *et al.*, 2004). Nos nódulos maduros do granuloma desenvolve-se uma bainha fibrosa de colágeno e outros componentes da matriz extracelular em torno do centro, rico em macrófagos. O infiltrado linfocítico é excluído e se agrega em torno do punho fibroso,

que define a periferia do nódulo (Ulrichs e Kaufmann, 2006; Russell, 2007; Russell *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de um granuloma organizado é resultado da resposta do hospedeiro a antígenos persistentes do *M. tuberculosis*, como proteínas e lipídios (Korb *et al.*, 2016). Os antígenos ESAT-6 e PIM2 induzem a expressão de matriz metaloproteinase (MMP-9) em células epiteliais vizinhas de macrófagos infectados, que promove o recrutamento de outros macrófagos para o sítio de infecção (Taylor *et al.*, 2006). Lipomanana (LM), lipoarabinomanana (Lamm), dimicolato de trealose (TDM) e fosfatidil inositol-manose são antígenos conhecidos por induzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por células mononucleares ao se ligarem a receptores de reconhecimento padrão, como o TLR2 (Perez *et al.*, 2000; Gilleron *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Dao *et al.*, 2004).

De acordo com o estágio de infecção do paciente, pode-se observar formas morfológicamente distintas de granulomas: sólido (composto de agregados densos de macrófagos infectados e não infectados, e linfócitos, sem necrose central); neutrofílico (com extensos infiltrados de granulócitos, com ou sem supuração do núcleo central); caseoso (extensa necrose com liquefação de células mortas, que pode progredir para formação de cavidades, rodeada por uma bainha de macrófagos e linfócitos) com ou sem fibrose ou calcificação (Russell, 2007; Russell *et al.*, 2009).

A formação do granuloma marca a fase de contenção da infecção, durante a qual, usualmente, não há sinais visíveis da doença e não há transmissão da infecção para outros hospedeiros (De Chastellier, 2009). Esse estágio clinicamente silencioso é caracterizado pelo nódulo sólido, um período de impasse, onde a carga bacilar permanece constante e a infecção entra em estado de latência (Russell, 2007; Russell *et al.*, 2009). No entanto, durante a doença ativa, esses granulomas tornam-se caseosos, com a presença de macrófagos necróticos que avançam para a formação de cavidades nos pulmões, com o derramamento de milhares de bacilos viáveis nas vias respiratórias, que irá resultar no desenvolvimento de uma tosse produtiva com possível disseminação da infecção para outros hospedeiros (Russell, 2007).

Apesar de acreditar que tal estrutura seja formada como uma resposta de defesa do sistema imunológico para conter a infecção, estudos em embriões de peixe-zebra infectados com *M. marinum*, linhagem próxima do *M. tuberculosis*, tem mostrado que a bactéria usa o granuloma em seu benefício, por propiciar o recrutamento de novos macrófagos, permitindo assim, sua disseminação para outras células hospedeiras e,

desta forma, criar novos nichos de crescimento bacteriano. Além disso, a partir de granulomas primários, pode ocorrer a saída de macrófagos infectados para estabelecer granulomas secundários, longe do local onde se iniciou a infecção (Davis e Ramakrishnan, 2009).

1.5 Aspectos imunológicos da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Os desafios na compreensão da resposta imunológica contra o *M. tuberculosis* surgem a partir da observação de que, apesar de aparentemente adequada, a resposta imunológica do hospedeiro não é capaz de erradicar o patógeno (Ernst, 2012).

Embora a imunidade inata apresente mecanismos capazes de eliminar o *M. tuberculosis* em um primeiro contato (Figura 01), tais estratégias podem falhar e sinais iniciados por ela podem resultar no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa que restringirá o crescimento do bacilo pela formação de granuloma, encaminhando a infecção, na maioria das vezes, para um estado característico de latência. Entretanto, por algum fator que resulte no comprometimento imunológico, a resposta imune adaptativa pode falhar em controlar a replicação do bacilo e a infecção pode assim progredir para uma forma ativa da doença, com surgimento de sinais e sintomas específicos da TB. Por outro lado, aqueles que conseguirem deter a infecção pelo *M. tuberculosis* através de uma resposta adaptativa eficiente podem viver anos sem manifestar sinais da doença. Embora, por algum motivo, relacionado ao comprometimento do sistema imunológico, a manutenção da infecção latente pode ser corrompida e um processo de reativação poderá evoluir para o desenvolvimento da TB (Hossain e Norazmi, 2013).

Neste contexto, estudos podem ser desenvolvidos com base nestes estágios distintos da infecção pelo *M. tuberculosis*, com a expectativa de que as respostas imunes formadas durante essas fases, forneçam uma compreensão mais clara quanto aos mecanismos imunológicos desenvolvidos contra a infecção pelo *M. tuberculosis* (Ernst, 2012).

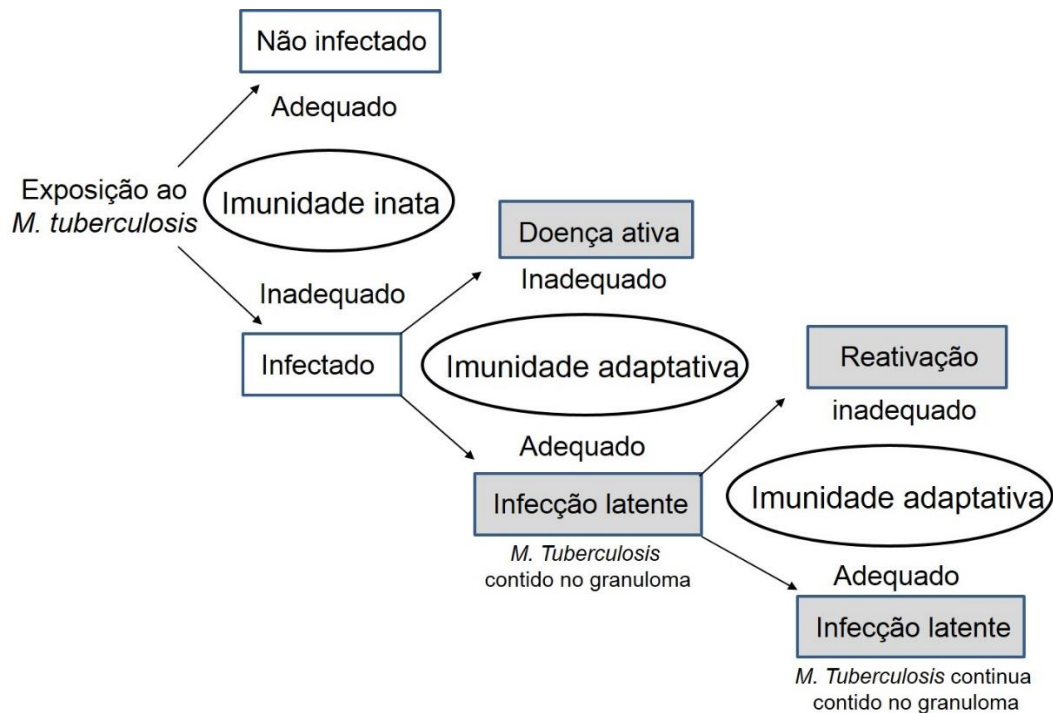


Figura 1- Perfil da patogênese desencadeada pela infecção do *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado: (Hossain e Norazmi, 2013).

1.5.1 Imunidade inata

Sendo a tuberculose uma infecção respiratória de transmissão aerogênica, é necessário que partículas aerossolizadas contendo o *M. tuberculosis*, oriundas de pacientes portadores da forma ativa da doença, entrem em contato com o sistema respiratório do hospedeiro em potencial (Kaufmann, 2001). Após adentrar no espaço alveolar, moléculas antigênicas, chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), são reconhecidas por células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos alveolares e células dendríticas, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Hossain e Norazmi, 2013). Outros receptores envolvidos são: (1) os receptores de fragmentos do complemento (CR), proteínas de membrana expressas na superfície de células fagocíticas que interagem especificamente com proteínas do complemento. Algumas são essenciais no processo de opsonização de micobactérias, como por exemplo, o componente C3b ou C3bi do complemento que se liga à superfície do *M. tuberculosis* tornando a fagocitose mais eficiente pelos macrófagos, através dos receptores CR1, CR2, CR3 e

CR4 (Schlesinger, 1993; Ferguson *et al.*, 2004); (2) os receptores ligados ao NOD (domínio de oligomerização de nucleotídeo), NLRs, são uma classe de proteínas citoplasmáticas que contém uma série de repetições ricas em leucina na região C-terminal. Estudos tem mostrado que camundongos deficientes em NOD2, um membro dos NLRs que interage com o dipeptídeo muramil (MDP), componente peptidoglicano bacteriano, apresentaram baixa produção de citocinas após infecção pelo *M. tuberculosis* (Divangahi *et al.*, 2008); (3) os receptores de manose (MRs) são lectinas do tipo C (dependente de cálcio) que se ligam a certos açúcares, especificamente manose, na superfície do patógeno. Tanto os monócitos como os macrófagos expressam MRs que estão associados à fagocitose do *M. tuberculosis* (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011; Hossain e Norazmi, 2013); (4) molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular e específica das células dendríticas (DC-SIGN) é um receptor expresso principalmente nas células dendríticas que além de atuar como um receptor de reconhecimento de patógenos, também está associada à função de receptor de adesão por favorecer a migração das células dendríticas e interações entre linfócitos T e células dendríticas (Geijtenbeek *et al.*, 2000); (5) receptores Fc γ R são os mediadores na captação do *M. tuberculosis* opsonizados por IgG. Atuam induzindo a geração de ROIs e promovendo a formação do fagolisossomo (Hossain e Norazmi, 2013).

Embora todos esses receptores desempenhem um papel importante na infecção pelo *M. tuberculosis*, dentre os vários PRRs, um outro grupo, os receptores Toll-like (TLRs) parecem desempenhar o papel mais importante na infecção. Eles interagem com ligantes específicos do *M. tuberculosis*, facilitando sua captação e dando início a uma cascata de sinalização intracelular que induz a produção de citocinas e moléculas co-estimuladoras pelas células hospedeiras, sendo essenciais para induzir uma resposta imune adaptativa e conter o crescimento do patógeno. Desta forma, os TLRs servem de elo entre a resposta imune inata e adaptativa no combate ao *M. tuberculosis* (Aderem e Ulevitch, 2000). Os TLRs envolvidos no reconhecimento bacteriano são, principalmente, os TLR2, TLR4 e o TLR9 (Krutzik e Modlin, 2004; North e Jung, 2004). O TLR2 apresenta o maior número de agonistas micobacterianos identificados, incluindo lipoproteínas, lipoarabinomananas (LAM) (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011). Já o TLR4 se liga a um constituinte da parede de bactérias gram negativas, o lipopolissacarídeo, um potente padrão molecular pro-inflamatório, que induz a expressão de NF- κ B e regula a produção de citocinas e quimiocinas, incluindo IL-1,

IL-6 e CXCL-8 (Chow *et al.*, 1999; Abel *et al.*, 2002). Com relação ao TLR-9, este receptor interage com o DNA micobacteriano que ativa macrófagos e induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Hemmi *et al.*, 2000). Além disso, Bafica *et al.* (2005) mostraram que TLR9 em combinação com TLR2 podem cooperar na defesa contra a infecção pelo *M. tuberculosis*. A ausência de um ou de outro, ou mesmo, a falta de ambos os receptores desencadeia uma resposta deficiente contra o *M. tuberculosis*.

Em resumo, estudando a imunidade inata na infecção pelo *M. tuberculosis*, pode-se dizer que não existe uma via específica para a entrada da micobactéria na célula fagocítica. No entanto, a resposta celular na infecção poderá ser influenciada pelo tipo de receptor utilizado para a internalização do *M. tuberculosis*, levando a sobrevivência do bacilo ou desencadeando uma resposta de proteção para o hospedeiro contra a tuberculose (Hossain e Norazmi, 2013).

Neste contexto, os macrófagos alveolares residentes e as células dendríticas fagocitam a bactéria, e as células infectadas passam a liberar citocinas pró-inflamatórias que levam ao recrutamento de mais células dendríticas, neutrófilos, células natural killer (NK) e monócitos do sangue (Teixeira *et al.*, 2007). Além disso, citocinas, como IL-12 e IL-18, liberadas pelas células infectadas, ativam as células NK, que podem destruir o patógeno diretamente ou matar monócitos infectados, ou podem, também, liberar IFN- γ , que irão induzir a atividade microbicida dos macrófagos alveolares no sítio de infecção (North e Jung, 2004). Apesar dos macrófagos alveolares formarem uma barreira bastante eficaz no estágio inicial da infecção, o *M. tuberculosis* desenvolveu mecanismos de evasão que permitem sua sobrevivência nestas células através do bloqueio da produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e da redução da acidificação do fagossomo, favorecendo seu crescimento (Flynn e Chan, 2001; Cooper, 2009).

Em camundongos, as células dendríticas, que são células clássicas na ativação e proliferação de linfócitos T CD4+, estão entre as primeiras células do pulmão a fagocitarem o *M. tuberculosis* e, somente depois de sua migração para os linfonodos do mediastino é que se detecta a expansão de células T CD4+ específicas ao *M. tuberculosis* nos pulmões (Wolf *et al.*, 2008; Jasenosky *et al.*, 2015). Surpreendentemente, tem sido evidenciado grande comprometimento das células dendríticas em sua função de ativação e indução da proliferação de células TCD4+ específicas, o que, em parte, se deve à reduzida apresentação de peptídeos associados ao MHC de classe II por essas células apresentadoras de antígeno (APCs)

(Wolf *et al.*, 2007). Entretanto, um estudo recente demonstrou que células dendríticas infectadas pelo *M. tuberculosis* passam a liberar antígenos solúveis do *M. tuberculosis* que são internalizados por outras células dendríticas que podem, em seguida, apresentar eficientemente esses antígenos para células T CD4+ virgens, tendo assim, início a resposta imune adaptativa (Srivastava e Ernst, 2014).

1.5.2 Imunidade adaptativa

Um dos principais destaques da resposta imune adaptativa ao *M. tuberculosis* é seu início tardio. Em estudo baseado no teste tuberculínico, que demonstra a infecção pelo *M. tuberculosis*, foi observado que o desenvolvimento da imunidade adaptativa ocorre, aproximadamente, 5 a 6 semanas após a exposição e infecção pelo bacilo (Wallgren, 1948). Ainda assim, apesar da resposta imune adaptativa se desenvolver e impedir o crescimento bacteriano, ela não elimina a bactéria e, assim, muitas pessoas tornam-se assintomáticas, sendo consideradas portadoras da infecção latente (Ernst, 2012). Moguees *et al.* (2001) demonstraram que o crescimento progressivo de bactérias em camundongos imunocompetentes infectados com linhagens virulentas do *M. tuberculosis* é controlado pelo acúmulo de células T efectoras CD4+ e CD8+ nos pulmões. Estas células contêm o tamanho da população bacteriana, até a morte desses camundongos entre 12-20 meses após a infecção. Estes dados confirmam que, apesar da imunidade adaptativa em camundongos ser suficiente para controlar o crescimento do *M. tuberculosis*, sua habilidade em erradicar a bactéria é limitada. Além disso, apesar da população de bactérias permanecer estável, uma subpopulação continua a se replicar durante o estágio de infecção latente, sugerindo que nesta fase exista uma dinâmica bacteriana em equilíbrio com o sistema imunológico (Ernst, 2012).

A imunidade protetora frente ao *M. tuberculosis* e outras micobactérias depende da ativação de linfócitos Th1 CD4+ e de citocinas produzidas pelas células Th1 (Kaufmann, 1993; Walzl *et al.*, 2011). Em humanos, a notável suscetibilidade de pacientes com AIDS à tuberculose tem demonstrado o crítico papel dos linfócitos T CD4+ na imunidade protetora (Lawn *et al.*, 2009). A ativação de linfócitos T CD4+ envolve o reconhecimento específico do antígeno bacteriano apresentado na superfície de macrófagos infectados associado a moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) de classe II, além da interação de moléculas co-estimulatórias, tais como a interação entre CD80/CD86-CD28 (Kaufmann, 2002; Teixeira *et al.*, 2007). Os linfócitos T CD4 ativados secretores de interferon gama (IFN- γ), são chamados de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1). Nos macrófagos, o IFN- γ induz a produção de RNIs e ROIs, aumentando sua atividade microbicida. Além disso, macrófagos ativados produzem moléculas imunomodulatórias que promovem a regulação de receptores de TNF- α e de NRAMP-1 (Cooper *et al.*, 2002). Os macrófagos ativados, principais células produtoras de TNF- α , também secretam interleucina (IL) 12 (IL-12) e IL-18, citocinas envolvidas na resistência a infecção pelas micobactérias (Murray, 1999). A IL-12 induz ativação, diferenciação e produção de IFN- γ , bem como a expansão de células Th1 antígeno-específicas (Murray, 1999). A produção de IFN- γ também pode ser induzida pelas citocinas IL-23, IL-18 e IL-27, um processo que pode ser acelerado quando IL-18 e IL-27 atuam em sinergismo com a IL-12 (Teixeira *et al.*, 2007).

O TNF- α está envolvido em múltiplos papéis na imunopatogênese da tuberculose, uma das mais relevantes funções é a regulação da resposta inflamatória estimulando a produção de IL-1 e IL-6 (Kaufmann, 2001). O TNF- α é secretado por macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, células dendríticas e linfócitos T. A secreção de TNF- α estimula a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e receptores de quimiocinas (Raja, 2004). Camundongos deficientes em TNF- α produzem níveis reduzidos de quimiocinas resultando na má formação de granulomas (Roach *et al.*, 2002). A IL-6, produzida por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T é uma citocina com atividade pró-inflamatória, importante no recrutamento de células para o sítio de infecção (Law *et al.*, 1996). Outras citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 são produzidas por células Th2, que promovem a imunidade humoral (Dlugovitzky *et al.*, 2000; Raja, 2004), e ainda atuam na regulação da resposta contra o *M. tuberculosis*. A IL-10, especialmente, é considerada uma importante citocina reguladora da resposta imunológica. Células T regulatórias CD4+CD25+ (Treg) participam na regulação da resposta imunológica secretando IL-10 e fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β) (Mchugh e Shevach, 2002). Estas células podem atuar na resposta imune contra doenças infecciosas facilitando a permanência do patógeno (Chen *et al.*, 2007) ou modulando a resposta imunológica na infecção, por regular a função de células T efectoras CD4+ e CD8+, assegurando que a resposta

imune mediada por células Th1 não sejam excessivas, minimizando lesões pulmonares na TB (Green *et al.*, 2010). Mason *et al.* (2007) mostraram que camundongos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv produziram IL-10 e TGF- β através de células T CD4+CD25+, e a neutralização destas citocinas resultou no aumento da produção de IFN- γ . Assim, na TB a IL-10 pode inibir a ativação de macrófagos, diminuindo a produção de IL-12, e conseqüentemente diminuindo os níveis de IFN- γ (Raja, 2004). Estudo tem mostrado que a IL-10 também pode atuar inibindo a apoptose de macrófagos infectados, Rodrigues *et al.*, 2009 observaram que a inibição da apoptose tinha uma correlação com o aumento da produção de IL-10 e diminuição na produção de TNF- α . Além disso, a produção de IL12 foi reduzida nos pontos em que foram observados níveis mais baixos de apoptose de macrófagos.

Além das citocinas, também tem sido observado uma importante contribuição das quimiocinas no controle da infecção pelo *M. tuberculosis* (Sadek *et al.*, 1998; Serbina *et al.*, 2008). A produção de CXCL-8, por exemplo, durante a infecção pelo *M. tuberculosis*, modula a migração de neutrófilos e linfócitos para o granuloma (Algood *et al.*, 2003). Outras quimiocinas, tais como, CXCL-9 e CXCL-10 também atuam na resposta imune contra a TB. Camundongos deficientes em CXCR-3, um receptor para CXCL-9 e CXCL-10, apresentaram atraso e alterações na formação do granuloma após a infecção pelo *M. tuberculosis* (Seiler *et al.*, 2003). Não menos importantes, as quimiocinas, CCL-2 e CCL-5, produzidas por macrófagos, também estão envolvidas na migração celular durante a infecção pelo *M. tuberculosis* (Algood *et al.*, 2003). Assim, pode-se concluir que as quimiocinas estão relacionadas com a ativação de respostas microbicidas, promovendo a migração de diferentes células para os tecidos infectados pelo *M. tuberculosis*, e levando à formação do granuloma (Serbina *et al.*, 2008). Quimiocinas proporcionam a migração de monócitos, células dendríticas, macrófagos ativados, células polimorfonucleares e linfócitos T para os espaços broncoalveolares durante a TB (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 2003). A interação de linfócitos TCD4+ e macrófagos têm um papel central na imunidade protetora contra o *M. tuberculosis*. No entanto, outros subgrupos de células T, tais como células T CD8+, células Th17, células T $\gamma\delta$ e célula T CD1 restritas, também auxiliam na resposta imune contra as micobactérias (Boom *et al.*, 2003).

Células T CD8+ podem reconhecer fragmentos peptídicos apresentados na superfície de células infectadas expressando MHC de classe I, os quais são expressos

em praticamente todas as células do organismo (Kaufmann, 2005). No caso das micobactérias, tem sido observado que elas induzem apoptose de células infectadas, que liberam vesículas apoptóticas contendo antígenos micobacterianos. Estas vesículas são internalizadas por células dendríticas que processam o material antigênico para subsequente apresentação, via MHC de classe I, aos linfócitos T CD8+, processo conhecido como apresentação cruzada (Winau *et al.*, 2006). Neste processo, antígenos fagocitados podem ter acesso ao citoplasma, sofrer degradação pelas proteases, conhecidas como proteassomas, retornar ao fagossomo através das proteínas transportadoras de antígenos (TAPs), onde se ligarão às moléculas de MHC de classe I e, subsequentemente, serão apresentadas aos linfócitos T CD8+ (Guermonprez *et al.*, 2003). Linfócitos T CD8+ ativados neste processo (também denominado de “cross-priming”) secretam IFN- γ , embora em menor quantidade em relação às células T CD4+. Além disso, células T CD8+ expressam granzimas, perforinas, o que as tornam capazes de induzir a lise macrófagos infectados (Boom *et al.*, 2003).

É aceito que a apoptose de macrófagos infectados constitui uma alternativa que pode contribuir para a defesa do hospedeiro. Este mecanismo impede a fuga do patógeno no interior da célula e prejudica sua propagação pelo sequestro e retenção das micobactérias dentro das vesículas apoptóticas que serão capturadas por outros fagócitos (Keane *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 2000). Porém, alguns estudos têm mostrado que linhagens virulentas de micobactérias, como o *M. bovis*, podem induzir menos apoptose que as linhagens de *M. bovis* atenuado, indicando que as micobactérias virulentas são capazes de modular a apoptose de macrófagos infectados, e assim beneficiar seu crescimento intracelular e disseminação às células adjacentes (Rodrigues *et al.*, 2009). Outro subgrupo de células T induzidos na infecção pelo *M. tuberculosis* é representado pelas células Th17 produtoras de IL-17. A IL-17 é uma potente citocina inflamatória capaz de induzir a expressão de quimiocinas e recrutar células para o tecido parenquimal (Khader e Cooper, 2008). A diferenciação de células Th17 é dependente das citocinas IL-23, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Durante a TB primária tanto o IFN- γ como a IL-17 são induzidas. Ambos apresentam alto potencial inflamatório e são capazes de induzir a expressão de quimiocinas que promovem o recrutamento de células e a organização do granuloma. No entanto, na fase crônica, é necessário que ocorra um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th17 para o controle

do crescimento bacteriano e limite da imunopatologia, uma vez que, a produção excessiva de IL-17 pode sustentar extensivo recrutamento de neutrófilos e causar danos ao tecido (Torrado e Cooper, 2010).

1.5.3 Da infecção latente à reativação da TB

Existem fortes evidências de que as micobactérias contribuem ativamente para o estado de equilíbrio na TB latente (Ernst, 2012). Estudo utilizando a tecnologia de DNA *microarray* para observar a mudança de perfil de expressão de genes do *M. tuberculosis* durante a infecção em camundongos imunocompetentes em comparação com a infecção em camundongos SCID, demonstrou que um subgrupo de genes foi ativado nos camundongos imunocompetentes, mas não foi identificado nos pulmões dos camundongos SCID (Talaat, Lyons *et al.*, 2004). Isto evidencia que o *M. tuberculosis* reprograma a transcrição de seus genes em resposta a pressão do sistema imune do hospedeiro (Talaat *et al.*, 2004). Essa mudança na expressão de genes já está clara pelo sistema de transdução de sinal, controlados pelo sistema DosR-DosS, que são induzidos por vários estímulos que prevalecem durante a TB latente, incluindo a hipóxia, baixa concentração de óxido nítrico, baixo pH e privação nutricional (Roupie *et al.*, 2007; Minch *et al.*, 2012).

A expressão desta rede de genes, bem como, a expressão de outros genes envolvidos, indica que o *M. tuberculosis* tem desenvolvido mecanismos específicos para adotar o estado de latência, mostrando, assim, que este comportamento não é resultado meramente do efeito supressivo da resposta imune sobre a replicação bacteriana (Ernst, 2012).

Da mesma forma, é possível que o *M. tuberculosis* adote mecanismos específicos para progredir do estado de latência para a reativação. Há fortes evidências de que a manutenção do ambiente imunológico dentro do granuloma é essencial para prevenir a reativação do *M. tuberculosis* dormente (Salgame, 2005). No entanto, a natureza exata das respostas imunológicas que irão resultar em um viés para a reativação da infecção latente ainda permanece indefinida. Em humanos, dois mecanismos foram identificados como possíveis para explicar a reativação da TB. O primeiro mecanismo envolve defeitos quantitativos e qualitativos das células T CD4+, como ocorre com indivíduos infectados pelo vírus HIV (Lawn e Churchyard, 2009). E

o segundo mecanismo está associado à neutralização terapêutica do TNF- α . Pacientes que fazem uso da terapia anti-TNF- α apresentam alto risco de desenvolver a TB ativa (Gardam *et al.*, 2003; Ernst, 2012). Como resultado de uma imunossupressão, o *M. tuberculosis* codifica 5 proteínas que se assemelham ao fator promotor de ressuscitação ou Rpf do *Micrococcus luteus*, que é uma proteína secretada, que mostra habilidade de ressuscitar o *M. luteus* de seu estado de dormência (Tufariello *et al.*, 2004). A deleção de um ou mais genes Rpf do *M. tuberculosis* pode gerar bactérias que apresentam ação de reativação prejudicada, indicando que esses genes podem participar da progressão da fase de latência para a reativação da infecção (Tufariello *et al.*, 2006).

Assim, diferentemente dos vírus que apresentam um padrão programado de genes, o *M. tuberculosis* pode regular a sua expressão gênica de acordo com os sinais de meio ambiente em que se encontra. Esta capacidade de regular a expressão gênica, além de permitir a sobrevivência e o crescimento bacteriano sob diversas condições, contribui para alterar o perfil de expressão de antígenos nas distintas fases de infecção, permitindo que as bactérias escapem do reconhecimento pelas células T específicas para determinado antígeno (Ernst, 2012).

1.5.4 Imunidade humoral frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

Para uma proteção eficaz contra a infecção pelo *M. tuberculosis* é essencial uma potente resposta mediada por células. Entretanto, elementos da imunidade inata e humoral podem desenvolver importantes papéis em auxiliar e potencializar a imunidade celular (De Valliere *et al.*, 2005; Hossain e Norazmi, 2013; Chan *et al.*, 2014; Achkar *et al.*, 2015). Os anticorpos, por exemplo, podem aumentar a resposta imune por meio de alguns mecanismos, incluindo opsonização (Armstrong e Hart, 1975); ativação do sistema complemento (Manivannan *et al.*, 2012); aumento da concentração citosólica de Ca²⁺ e liberação de oxidantes que promovem a morte intracelular do bacilo (Malik *et al.*, 2000); potencialização da imunidade mediada por células (De Valliere *et al.*, 2005); e remoção de antígenos imunomodulatórios micobacterianos (Glatman-Freedman *et al.*, 2000). Embora o *M. tuberculosis* resida dentro dos macrófagos nos pulmões, a necrose, que representa uma manifestação clínica clássica da TB, é um estágio da doença em que o bacilo pode ser encontrado

no meio extracelular e pode estar potencialmente em contato com os anticorpos (Teitelbaum *et al.*, 1998).

Outra importância na ação dos anticorpos está relacionada com a localização de imunoglobulinas na superfície da mucosa respiratória como primeira linha de defesa contra a infecção por micobactérias. A imunoglobulina A (IgA) em sua forma secretada (slgA) nas mucosas respiratórias apresenta funções importantes em bloquear a entrada de organismos patogênicos e prevenir possíveis infecções (Lamm, 1997). Em estudo realizado por Alvarez *et al.* (2013) verificou-se que a pré-incubação do *M. tuberculosis* com slgA resultou em uma diminuição na carga bacteriana com melhor formação de granulomas nos pulmões de camundongos desafiados com o *M. tuberculosis* vivo. Além disso, Tjarnlund *et al.* (2006) mostraram que o *M. tuberculosis* apresentou sua entrada bloqueada pela slgA nos pulmões em estudos utilizando camundongos.

Estudos sobre a resposta imune na TB têm atribuído pouca importância à imunidade humoral, em decorrência das contradições de sua eficiência no combate à infecção, como foi demonstrado em alguns trabalhos utilizando modelos murinos deficientes em linfócitos B (Vordermeier *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997). Porém, esta controvérsia do papel dos linfócitos B e seus produtos na resposta imune frente à TB tem sido questionada por pesquisas que mostraram progressão da infecção em camundongos deficientes em células B (Bosio *et al.*, 2000; De Valliere *et al.*, 2005). Outros estudos também confirmam a importância das células B e dos anticorpos no combate à TB. Tjarnlund *et al.* (2006) demonstraram que camundongos deficientes em receptores de imunoglobulina (Ig) polimérica apresentaram maior susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*.

Roy *et al.* (2005) mostraram que o tratamento com imunoglobulina intravenosa (IVIG) em camundongos infectados com *M. tuberculosis*, reduziu a carga bacteriana no baço e nos pulmões dos animais. Além disso, estudos mais recentes tem apresentado notória função dos linfócitos B na regulação da resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*. Kozakiewicz *et al.* (2013) demonstraram que linfócitos B podem regular a neutrofilia durante a infecção pela modulação da resposta de IL-17. Enquanto Phuah *et al.* (2016), por sua vez, mostraram que a depleção de linfócitos B, através do tratamento com Rituximab e anticorpos anti-CD20 em macacos infectados com *M. tuberculosis*, não apresentou nenhum efeito clínico durante a infecção ativa. Entretanto, análises individuais dos granulomas revelaram que a depleção de

linfócitos B alterou a resposta local de linfócitos T e citocinas, com aumento da carga bacteriana e baixos níveis de inflamação. Estes dados indicam que os linfócitos B podem modular a resposta granulomatosa local em macacos infectados pelo *M. tuberculosis* na infecção ativa (Phuah *et al.*, 2016)

A importância dos anticorpos na TB também foi demonstrada pela utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) contra antígenos específicos da micobactéria. Teitelbaum *et al.* (1998) demonstraram que mAbs específicos contra o antígeno de superfície liporabinomana conferiram proteção a camundongos infectados com o *M. tuberculosis*. É interessante notar que tais anticorpos não apresentaram nenhuma atividade bactericida ou inibitória contra a infecção ou replicação bacteriana. Entretanto, foi observado que estes anticorpos anti-LAM alteraram a natureza de granulomas nos pulmões, sugerindo uma possível atuação dos anticorpos em intensificar a resposta imunológica mediada por células.

De acordo com os resultados obtidos nas pesquisas com mAbs, alguns estudos demonstraram que anticorpos podem atuar modificando a expressão de citocinas e, desta forma, influenciar as respostas mediadas por células. Em seus experimentos, Maglione *et al.* (2008) mostraram que camundongos C57BL/6 deficientes em receptores com função inibitória $Fc\gamma RII B$ apresentaram aumento do controle da infecção com elevada resposta Th1 nos pulmões, evidenciado por aumento na produção de $IFN-\gamma$ por células T CD4+, e elevada expressão de MHC de classe II e moléculas coestimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). De forma oposta, camundongos C57BL/6 apresentando remoção da cadeia γ do receptor $Fc\gamma$, mostraram grande susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*, com exacerbada imunopatologia, associado ao aumento da produção da citocina IL-10 (Maglione *et al.*, 2008; Maglione e Chan, 2009). Além disso, Maglione *et al.* (2007) observaram que camundongos deficientes em células B, infectados com 100 CFU do *M. tuberculosis*, apresentaram forte imunopatologia, com elevada produção de IL-10 nos pulmões. Aumentando o inóculo para 300 bacilos viáveis, ocorreu aumento da susceptibilidade associado à elevada mortalidade. Notavelmente, esse quadro de progressão da infecção foi revertido com a transferência adotiva de células B. Baseados nestes estudos, Maglione e Chan (2009) sugeriram que a ligação de imunoglobulinas produzidas por células B em receptores $Fc\gamma$ de células apresentadoras de antígenos poderia modular a resposta imunológica frente ao *M. tuberculosis*.

Muitas questões sobre o papel das células B e dos anticorpos permanecem ainda sem respostas na imunidade frente à TB. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para revelar como estas células atuam de forma a otimizar a resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*, e possivelmente, tais pesquisas poderão auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas e métodos de diagnóstico na TB.

1.6 Diagnóstico da tuberculose

O diagnóstico precoce e o tratamento eficaz são bases para a interrupção da cadeia de transmissão da TB e controle da doença em qualquer grupo social (Dalcolmo *et al.*, 2007). Pacientes TB com baciloscopia negativa podem representar um grande problema para os programas de controle da doença, sendo necessário o desenvolvimento de métodos mais eficientes que consigam auxiliar o exame microscópico.

Os primeiros exames a serem solicitados no diagnóstico da tuberculose pulmonar são a radiografia de tórax e a pesquisa de BAAR (bacilo álcool ácido resistente) no escarro. Entretanto, apesar do exame BAAR ter elevado valor preditivo positivo (>95%), o teste apresenta baixa sensibilidade (40-60%) (Conde *et al.*, 2009). No exame de raio X, por sua vez, apesar de grande importância no diagnóstico da TB primária, as alterações pulmonares não são demonstradas em até 15% dos casos (Burrill *et al.*, 2007). Com o intuito de um diagnóstico mais eficaz, utiliza-se a cultura que permite a identificação do *M. tuberculosis* e a realização do teste de sensibilidade, além de aumentar o rendimento do diagnóstico em 20-40%. Os meios sólidos mais utilizados são Löwenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh. No entanto, a cultura em meio sólido requer cerca de 2 à 8 semanas para mostrar o resultado (Kudoh e Kudoh, 1974; Conde *et al.*, 2009). Por esse motivo, alguns laboratórios de referência utilizam sistemas automatizados a partir de culturas líquidas (BACTEC MGIT 960 System; Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), onde o tempo para obtenção do resultado é reduzido para 10 à 40 dias (Conde *et al.*, 2009). A cultura é indicada nas seguintes situações: suspeita clínica e/ou radiológica com baciloscopia repetidamente negativa; suspeito de TB com amostras paucibacilares (poucos bacilos); casos de retratamento; pacientes HIV positivo; populações vulneráveis (detentos, profissionais da área de saúde, moradores de rua e populações institucionalizadas em albergues, hospitais

psiquiátricos e asilos), suspeita de resistência medicamentosa e suspeita de TB extrapulmonar (Conde *et al.*, 2009).

Uma nova perspectiva para o diagnóstico de pacientes TB com baciloscopia negativa e/ou resistência a rifampicina é o método de amplificação do ácido nucleico Xpert®MTB/Rif. Tal metodologia pode detectar rapidamente, no máximo em duas horas, a presença do *M. tuberculosis*, e identificar mutações mais frequentemente associadas à resistência a rifampicina (Helb *et al.*, 2010; Trebucq *et al.*, 2011). Um trabalho de meta-análise apresentou sensibilidade de 98% quando avaliados pacientes com TB pulmonar com cultura de escarro positivo e sensibilidade de 67% nos casos de pacientes com cultura de escarro negativa, sendo ambos com uma especificidade de 99% (Steingart *et al.*, 2013). No entanto, apesar de apresentar bom desempenho no diagnóstico da TB, o teste Xpert®MTB/Rif tem um custo operacional relativamente alto e requer ambientes com fornecimento de energia estável e temperatura ambiente adequada, o que dificulta e limita sua aplicação em países com baixa renda (Trebucq *et al.*, 2011). Além disso, o teste não consegue diagnosticar a infecção latente (Walzl *et al.*, 2011).

Existem duas abordagens imunológicas para o rastreamento de indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis*. O teste “in vivo” denominado prova tuberculínica ou o teste “ex vivo” denominado de ensaio de liberação de IFN- γ (IGRAs) (Chaves *et al.*, 2015). No Brasil, a prova tuberculínica tem sido o teste de escolha para o diagnóstico imunológico da infecção latente em adultos e crianças (Saúde, 2011). A prova tuberculínica utiliza o PPD, derivado proteico composto por mais de duzentas proteínas do *M. tuberculosis*, aplicado por via intradérmica (0,1 ml = 2 UI) no antebraço. Embora seja o método de escolha, o teste apresenta algumas limitações, pois gera reatividade cruzada em indivíduos vacinados com o BCG e/ou expostos a micobactérias do ambiente, produzindo resultados falsos positivos (Pilheu, 1998; Wang *et al.*, 2002; Lalvani e Pareek, 2010). Além disso, a sensibilidade da prova tuberculínica é extremamente dependente da condição imunológica do indivíduo testado, sendo prejudicado naqueles que se encontram imunocomprometidos (Lalvani e Pareek, 2010). Já os métodos imunológicos baseado na quantificação “in vitro” da resposta imune celular, têm utilizado antígenos do *M. tuberculosis*, como o ESAT-6 e CFP-10, que têm se mostrado como bons marcadores da infecção por *M. tuberculosis* (Arend *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2007; Mattos *et al.*, 2010). O reconhecimento destas proteínas por células do sistema imunológico durante a TB, bem como a ausência

dessas proteínas no genoma do BCG e de muitas micobactérias do ambiente (Goletti *et al.*, 2006), têm reforçado o potencial desses antígenos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico (Abramo *et al.*, 2006). Alguns métodos baseados na detecção de IFN- γ em resposta aos antígenos ESAT-6 e CFP-10 já estão disponíveis comercialmente: T-SPOT.TB (TS-TB), QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) e QuantiFERON-TB Gold “in tube” QFT-GIT (Cascante *et al.*, 2007; Bocchino *et al.*, 2008). Há evidências de que a sensibilidade dos IGRAs é maior que a sensibilidade do teste tuberculínico; no entanto, para ambos os testes, a impossibilidade de uma clara diferenciação entre a doença ativa da infecção latente é ainda um forte entrave para a implementação destes testes (Redelman-Sidi e Sepkowitz, 2013).

Outro método imunológico comumente estudado para o diagnóstico da TB é baseado na detecção de anticorpos séricos contra antígenos do *Mycobacterium* (Palma-Nicolas e Bocanegra-Garcia, 2007). Métodos sorológicos são vantajosos por serem de fácil aplicação, por apresentarem baixo custo e por serem pouco invasivos (Palma-Nicolas e Bocanegra-Garcia, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Nogueira *et al.*, 2010). Entretanto, ainda não existem exames sorológicos padronizados ou validados para o diagnóstico da TB (Conde *et al.*, 2009). Além disso, em 2011, a OMS elaborou um documento onde orienta a não utilização dos testes sorológicos no diagnóstico da TB (Who, 2011).

Neste contexto, mais pesquisas direcionadas para a identificação de biomarcadores correlacionados com o diagnóstico e com o monitoramento de um tratamento de sucesso seria um grande avanço na TB. Tais marcadores, incluindo subtipos de anticorpos, citocinas e quimiocinas, poderiam auxiliar na identificação do estágio de infecção do *M. tuberculosis* possibilitando indicar se o paciente apresenta a doença ativa, infecção latente ou mesmo dar a noção de que o tratamento realizado está sendo eficaz (Mattos *et al.*, 2010; Walzl *et al.*, 2011; Clifford *et al.*, 2015).

1.7 Tratamento

O tratamento dos indivíduos com tuberculose deve ser realizado segundo uma série de critérios pré-estabelecidos, que abordem idade e peso do paciente, presença concomitante de HIV/SIDA e carga bacilar (Hart *et al.*, 1996). Tais critérios somados a associação medicamentosa adequada, às doses empregadas e ao tempo de

tratamento, são os princípios básicos para a quimioterapia, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos e assegurando, assim, a cura do paciente (Saúde, 2011).

É considerado com TB multirresistente o indivíduo infectado com uma linhagem isolada do *M. tuberculosis* que é resistente a pelo menos uma das drogas pertencentes à primeira linha de tratamento da tuberculose (Dalcolmo *et al.*, 2007). Dentro do grupo de pacientes TB multirresistentes existem aqueles que apresentam resistência primária, quando o paciente nunca recebeu nenhum tratamento anterior e já apresenta resistência às drogas usadas na quimioterapia. Usualmente, esse paciente foi infectado por um microrganismo já resistente às drogas. Por outro lado, a resistência secundária ou adquirida é ocasionada pelo uso inadequado dos fármacos, administração irregular e, principalmente, pelo abandono do tratamento (Mitchinson, 1998; Iseman, 1999; Dalcolmo *et al.*, 2007).

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) do Ministério da Saúde propôs um novo esquema para tratar a doença, justificando este fato através da constatação do aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%), e à rifampicina (de 1,1% para 1,4%), observado no II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos anti-TB, realizado no período de 2007-2008, em comparação com o I Inquérito Nacional, conduzido em 1995 a 1997. Basicamente, as mudanças ocorridas envolveram: alteração das dosagens de pirazinamida e hidrazida; introdução de uma quarta droga, o etambutol; e a formulação das quatro drogas num único comprimido com a dose fixa combinada (Vranjac, 2010; Saúde, 2011). Essa alteração no esquema de tratamento contra a TB ainda agrega benefícios como a redução do número de comprimidos a serem ingeridos pelo doente, impossibilidade de tomada isolada das drogas e simplificação da gestão farmacêutica em todos os níveis (Vranjac, 2010).

A partir de 2009, a apresentação farmacológica do esquema de tratamento anti-TB passou a ser conduzida em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos de primeira linha: rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E). Sendo os dois primeiros meses de tratamento de fase intensiva com a administração de comprimidos de doses fixas combinadas, e na fase de manutenção (4 meses seguintes), apenas cápsulas de rifampicina e isoniazida (Vranjac, 2010; Saúde, 2011). Essa recomendação e a apresentação farmacológica são as preconizadas pela Organização Mundial de Saúde e utilizadas na maioria dos países, para adultos e adolescentes (Who, 2015).

O tratamento dos doentes bacilíferos é atividade prioritária de controle da TB, uma vez que permite interromper a cadeia de transmissão. A transmissibilidade está presente desde os primeiros sintomas respiratórios, caindo rapidamente após o início do tratamento efetivo. Durante muitos anos considerou-se que, após quinze dias de tratamento, o paciente já não transmitia a doença. No entanto, com base em evidências de transmissão da TB resistente às drogas, recomenda-se que este fato seja confirmado através da negatividade da baciloscopia (Saúde, 2011).

Outro importante componente no controle da TB, tanto em países de baixa como de alta prevalência, é o tratamento de indivíduos com infecção latente. Estudos mostram que o tratamento preventivo pode diminuir em até 90% o risco da infecção latente evoluir para a doença ativa (Parekh e Schluger, 2013). Para o tratamento da infecção latente, o uso da isoniazida diariamente durante seis a nove meses tem sido o regime mais amplamente utilizado, embora outros regimes, tais como o uso diário de isoniazida e rifampicina durante 3 meses, ou uso de rifampicina diariamente durante 4 meses, também tem sido recomendados (Parekh e Schluger, 2013; Getahun *et al.*, 2015). O critério de adoção do regime de tratamento do indivíduo diagnosticado com infecção latente em grande escala pode ter implicações significativas nos esforços para eliminação da TB (Parekh e Schluger, 2013).

Todos os casos com baciloscopia negativa e suspeita clínica e/ou radiológica de TB devem ter cultura solicitada e serem encaminhados para pesquisa diagnóstica em um centro de referência. O tratamento para caso suspeito de TB sem comprovação bacteriológica pode ser iniciado por diagnóstico de probabilidade, após tentativa de tratamento com antimicrobianos de largo espectro, sem melhoras dos sintomas e após criteriosa avaliação clínica. Uma vez iniciado o tratamento, ele não deve ser interrompido, salvo após uma rigorosa revisão clínica e laboratorial que determine mudanças de diagnóstico (Saúde, 2011).

1.8 Antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*

Por serem reconhecidos por células do sistema imunológico durante a infecção e por estarem ausentes em muitas micobactérias não patogênicas e nas linhagens de *Mycobacterium bovis* BCG, as proteínas ESAT-6 e CFP-10 do *M. tuberculosis* são muito utilizadas nas pesquisas de novas vacinas e novos métodos de diagnóstico (Van

Pinxteren *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2002). Os genes que codificam estas proteínas estão situados na região de diferença 1 (RD1), região cromossômica presente na maioria das espécies virulentas de micobactérias (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. zulgai* e *M. flavescens*), e ausentes em todas as cepas de *M. bovis* BCG e em muitas micobactérias não patogênicas do ambiente (Harboe *et al.*, 1996; Abramo *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2008).

A região RD1 abrange nove genes do cromossomo do *M. tuberculosis* que compreende o Rv3871 até o Rv3879c (Cole *et al.*, 1998). Dois desses genes, Rv3874 (*esxB*) e Rv3875 (*esxA*), codificam as proteínas de baixo peso molecular, “*culture filtrate protein-10 kDa*” (CFP-10) e “*early secreted antigenic target-6*” (ESAT-6), respectivamente (Berthet *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2008). ESAT-6 e CFP-10 são secretados por um sistema especializado pertencentes a região RD-1 (ESX-1), também conhecido por sistema de secreção tipo VII, responsável por secretar o ESAT-6 juntamente com CFP-10 (Pym *et al.*, 2002), configurando um complexo heterodimérico, em proporção de 1:1 (Renshaw *et al.*, 2005), com grande estabilidade bioquímica (Meher *et al.*, 2006). Tais proteínas parecem ser essenciais para o processo de virulência destes patógenos, uma vez que, a reintrodução desta região RD-1 no genoma do *M. bovis* BCG aumenta sua imunogenicidade e o torna virulento (Pym *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2012).

ESAT-6 e CFP-10 são proteínas imunodominantes secretadas nos estágios iniciais de infecção e têm-se mostrado como bons marcadores da infecção pelo *M. tuberculosis* na fase ativa da doença (Pollock e Andersen, 1997; Arend *et al.*, 2000; Abramo *et al.*, 2006). Respostas a essas proteínas, mediadas por linfócitos T de pacientes com TB e de camundongos infectados, são caracterizadas por forte secreção de IFN- γ (Harboe *et al.*, 1998; Mustafa *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2004). De um modo geral, vários estudos têm indicado ESAT-6 e CFP-10 como indutores potenciais de resposta Th1 (Meher *et al.*, 2007). Testes baseados na detecção de IFN- γ por células T em resposta aos antígenos ESAT-6 e CFP-10 têm apresentado elevada sensibilidade (73-86%) e especificidade (93-100%) no diagnóstico de pacientes com tuberculose (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Kanunfre *et al.*, 2008; Soysal *et al.*, 2008).

Outro grupo de proteínas do *M. tuberculosis* promissor no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico inclui as proteínas expressas pela ativação de genes DosR (Dormancy Survival Regulator). Trabalhos recentes têm avaliado a produção de

IFN- γ por células T de pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* em resposta aos antígenos DosR com o objetivo de discriminar indivíduos com infecção latente de pacientes com a doença (Schuck *et al.*, 2009; Goletti *et al.*, 2010; Chegou, Black, *et al.*, 2012). Proteínas codificadas pelos genes DosR são induzidas, em cultura, através de vários estímulos. Tais modelos tentam imitar, em parte, as condições encontradas pelos bacilos dormentes nos granulomas pulmonares (Roupie *et al.*, 2007; Minch *et al.*, 2012).

Culturas do *M. tuberculosis* sob baixa tensão de oxigênio, associado ao stress redox e presença de NO, são fatores que frequentemente associam-se com o estabelecimento e manutenção da tuberculose latente (Wayne e Sohaskey, 2001). Dentro deste contexto, a ativação do fator de transcrição Rv3133c, denominado regulador de sobrevivência na dormência (*dormancy survival regulator* – DosR) resulta na expressão de aproximadamente 50 genes sob seu controle direto, pertencentes ao denominado régulon DosR, sendo responsáveis por alterações metabólicas que irão preparar a micobactéria para o período denominado de dormência (Kumar *et al.*, 2008; Taneja *et al.*, 2010; Chaves *et al.*, 2015). Contudo, a participação do régulon DosR é restrita apenas à preparação para o estado de dormência (Park *et al.*, 2003), sendo que logo após seu estabelecimento de fato, outro conjunto de genes, denominado EHR (*enduring hypoxic response*), realiza a manutenção das funções vitais do patógeno até que as condições necessárias para sua reativação sejam aparentes (Rustad *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2015).

Sob condições anaeróbicas presentes no granuloma, o *M. tuberculosis* induz uma maciça expressão da proteína 16kDa ou HspX (Rv2031c), que é uma proteína de choque térmico codificada pela região DosR do genoma micobacteriano. Essa proteína é mais detectada em indivíduos com TB latente que pacientes com TB ativa (Demissie *et al.*, 2006; Abebe *et al.*, 2007). Embora essa proteína pertença a uma classe amplamente distribuída, ela foi detectada somente no *M. bovis* BCG e no complexo *M. tuberculosis* (Yuan *et al.*, 1996). Resultados recentes em nosso laboratório mostraram níveis elevados de anticorpos anti-16kDa no soro de pacientes com 1-3 meses de tratamento, quando comparados com pacientes com TB ativa e pacientes com 6 meses de tratamento. O início da quimioterapia está relacionado com a destruição de bactérias e consequente liberação de grande quantidade de proteínas citosólicas, levando a intensa estimulação da resposta humoral e aumento dos níveis de anticorpos anti-16kDa (Mattos *et al.*, 2010). Os resultados desse estudo sugerem

que suspeitos com baciloscopia negativa possam iniciar o tratamento e após alguns dias serem avaliados através da detecção de anticorpos anti-16kDa. Neste caso, níveis elevados de anticorpos anti-16kDa podem ser indicativo de diagnóstico positivo e indicação de tratamento regular. Esses dados enfatizam a importância de se investigar se esse tipo de resposta também ocorre contra outros antígenos DosR do *M. tuberculosis*, sendo esta investigação a principal motivação deste trabalho.

Além das proteínas mencionadas anteriormente, também estão sendo descritos e estudados genes presentes no *M. tuberculosis* que codificam proteínas associadas à reativação do *M. tuberculosis* de seu estado de latência. Mukamolova *et al.* (1998) em estudos envolvendo o *Micrococcus luteus*, foram os primeiros a descrever os genes responsáveis por codificar a proteína denominada fator promotor de ressuscitação ou Rpf. A Rpf do *M. luteus* é uma proteína secretada de aproximadamente 16kDa, que participa da ativação do crescimento de culturas de *M. luteus* antes em estado de dormência ou em fase estacionária (Tufariello *et al.*, 2004). Genes similares ao Rpf de *M. luteus* foram descritos em uma variedade de bactérias Gram positivas, incluindo *Streptomyces coelicor* e *Corynebacterium glutamicum*, e em *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* (Tufariello *et al.*, 2004). O *M. tuberculosis* e o *M. bovis* possuem cinco genes homólogos ao Rpf do *M. luteus*, que codificam proteínas com características e propriedades similares às proteínas Rpf do *Micrococcus luteus*, incluindo a sua habilidade de “ressuscitar” micobactérias. São elas: Rv0867c (rpfA), Rv1009 (rpfB), Rv1884c (rpfC), Rv2389c (rpfD), e Rv2450 (Mukamolova *et al.*, 2002; Tufariello *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2010). A expressão destas proteínas foi observada em culturas de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG em crescimento ativo. Além disso, a expressão de genes rpf foi detectada em tecidos humanos infectados pelo *M. tuberculosis* (Mukamolova *et al.*, 2002; Tufariello *et al.*, 2004). Genes rpf desenvolvem diferentes padrões de expressão quando analisados em culturas de crescimento sob hipóxia, privação de nutrientes e baixo pH. Estas diferentes adaptações na expressão dos genes rpf sugerem que proteínas Rpf do *M. tuberculosis* exercem diferentes funções (Gupta *et al.*, 2010).

Desta forma, um melhor entendimento dos mecanismos de resposta imune contra proteínas Rpfs pode ser de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da tuberculose (Commandeur *et al.*, 2011). Neste sentido, é fundamental avaliar a resposta imune frente aos diversos antígenos do *M. tuberculosis* expressos em diferentes fases da infecção, assim como buscar

biomarcadores associados à TB ativa e TB latente, que possam contribuir para aprimorar o diagnóstico da TB e favorecer a diferenciação entre os estágios da infecção causada pelo *M. tuberculosis* (Schuck *et al.*, 2009; Chegou, Essone, *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2015; Mothé e Antas, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas imunes humoral e celular frente a antígenos relacionados a diferentes fases da infecção causada pelo *M. tuberculosis*, em pacientes com tuberculose pulmonar antes e após o tratamento, e em indivíduos com TB latente, investigando biomarcadores associados à infecção e a doença.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar níveis séricos de anticorpos IgG1 contra antígenos DosR (Rv1733, Rv1737, Rv2029, Rv2628), antígenos Rpf (Rv0867, Rv2389), e antígenos secretados na fase ativa da infecção pelo *M. tuberculosis* (ESAT-6/ CFP-10, Rv0717, Rv3353) em pacientes com TB pulmonar, antes e após o tratamento quimioterápico, comparando com os resultados obtidos de controles sadios.
- Avaliar o perfil de anticorpos IgG e IgG1 no soro de indivíduos contatos TB com diagnóstico de TB latente (PPD positivo), comparando com pacientes com TB pulmonar ativa e com controles sadios PPD negativo, utilizando antígenos DosR e Rpf selecionados.
- Avaliar a produção de IFN- γ e CXCL-10 por PBMC de indivíduos contatos TB, pacientes com TB pulmonar ativa e controles sadios PPD negativo, utilizando antígenos DosR e Rpf selecionados.
- Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas secretadas por PBMC de pacientes com TB pulmonar em diferentes fases da infecção e do tratamento quimioterápico, em resposta a antígenos do *M. tuberculosis*.
- Quantificar níveis séricos de quimiocinas CCL-2, CXCL-8, CXCL-9 e CXCL-10 de contatos TB com diagnóstico de infecção latente, pacientes com TB pulmonar antes e após o tratamento quimioterápico, e controles sadios PPD negativo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Os pacientes com tuberculose (TB) envolvidos neste trabalho foram recrutados do Setor de Pneumologia e Tisiologia da Prefeitura de Juiz de Fora – MG e do Hospital Universitário de Juiz de Fora – MG, onde foram diagnosticados através de exames clínicos, radiológicos e exame de baciloscopia e/ou cultura positivas. Foram critérios de exclusão: doença renal, disfunção hepática/alcoolismo, hipertensão arterial, diabetes ou outras doenças sistêmicas, gravidez, idade menor que 18 anos e maior que 65 anos, pacientes HIV-positivos. Além disso, todos os indivíduos selecionados para este estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme consta no parecer aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF em novembro de 2011, registrado sob número 288/2011.

Neste trabalho foram utilizadas inicialmente, para estudo da reatividade de anticorpos IgG1, amostras de soro de 106 pacientes com tuberculose pulmonar, sendo 34 pacientes com TB ativa, 46 pacientes com 1 a 3 meses de tratamento, 20 pacientes que completaram 6 meses de tratamento regular, e 6 pacientes que completaram um ano após o início do tratamento regular. Também foram utilizados 20 soros de indivíduos saudáveis coletados de alunos e professores dos cursos da área de saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG (Tabela 1). Todas essas amostras de soros faziam parte do banco de soros do Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Os soros estavam estocados à -20°C até sua utilização nos ensaios.

Para estudar o perfil de resposta dos indivíduos com infecção latente, foi realizada a coleta de sangue de 9 indivíduos contatos com infecção latente (LTBI) (Tabela 3). O diagnóstico de infecção latente foi atribuído às pessoas que tiveram contato com o paciente com TB pulmonar ativa, tendo o resultado do teste PPD \geq 5mm, apresentando exames radiológicos normais e ausência de sinais e sintomas da doença. Além disso, foram considerados contatos todas as pessoas que conviveram no mesmo ambiente com paciente com TB pulmonar ativa, prioritariamente com baciloscopia positiva no momento do diagnóstico da TB. Esse convívio pode ter acontecido em casa e/ou em ambientes de trabalho ou instituições de longa

permanência (Saúde, 2011). As coletas de sangue dos indivíduos com infecção latente foram realizadas nos mesmos locais onde foram realizadas as coletas de sangue de pacientes com TB. Foram coletadas, no mesmo período de coleta dos contatos TB, 65 amostras de sangue de pacientes com TB pulmonar em diferentes fases de tratamento, sendo 25 amostras de sangue de pacientes com TB pulmonar ativa, com 0 à 15 dias de tratamento (TB 0M); 20 amostras de sangue de pacientes com 3 meses de quimioterapia, que foram negativos nos exames de baciloscopia após dois meses do início do tratamento (TB 3M); e 20 amostras de sangue de pacientes com 6 meses de quimioterapia que também apresentaram exames de baciloscopia negativo após seis meses de tratamento (TB 6M) (Tabela 2).

Foi realizada uma triagem, através da prova tuberculínica, para a obtenção de amostras de soros de indivíduos controles sadio PPD positivo (PPD+), e de indivíduos controles sadio PPD negativo (PPD-). A prova tuberculínica foi realizada no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Foram convidados para participar do estudo alunos e funcionários públicos recrutados dos cursos da área de saúde da UFJF. Para realização do teste, foi aplicado, por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, o derivado proteico PPD RT-23 (Staten Serum Institute, Dinamarca), na dose de 0,1mL, equivalente a 2UT - unidades de tuberculina. A leitura do teste foi realizada 72 horas após a aplicação do PPD e foram considerados PPD+ aqueles cuja endureção foi ≥ 5 mm, e PPD- aqueles, cuja endureção foi < 5 mm. Quinze dias após a realização do teste tuberculínico, foi feita a coleta de sangue de 10 indivíduos saudáveis PPD+ e 16 indivíduos saudáveis PPD-. Para cada ensaio realizado, o número de controles foi escolhido, aleatoriamente, dentro desse conjunto de amostras (Tabela 4).

Tabela 1- Características gerais dos pacientes com TB pulmonar e controles sadio da primeira etapa do projeto.

	Pacientes com TB pulmonar (n=106) ^a				TB Total (n=106)	CS ^b (n=20)
	0M (n=34)	1-3M (n=46)	6M (n=20)	AT (n=6)		
Idade						
(Média ± SD)	36 ± 15	32 ± 10	38 ± 17	38 ± 11	35 ± 13	31 ± 12
(variação)	18 - 65	18 - 54	18 - 65	30 - 54	18 - 65	18 - 53
Gênero						
Masculino (%)	23 (68)	31 (67)	15 (75)	4 (67)	73 (69)	14 (70)
Feminino (%)	11 (32)	15 (33)	5 (25)	2 (33)	33 (31)	06 (30)
BCG^c						
Sim (%)	23 (68)	36 (78)	19 (95)	04 (68)	82 (77)	20 (100)
Não (%)	11 (32)	10 (22)	01 (05)	02 (32)	24 (33)	00 (00)

a – 106 pacientes com TB pulmonar, sendo 34 pacientes na fase ativa de infecção (0M), 46 que receberam 1 à 3 meses de tratamento (1-3M), 20 que completaram 6 meses de quimioterapia (6M) e 6 pacientes um ano após o tratamento (AT). Essas amostras de soros foram obtidas do banco de soros TB do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF.

b – 20 Controles sadios vacinados com BCG.

c – Indivíduos que apresentam cicatriz vacinal (BCG).

Tabela 2- Dados clínicos e demográficos e tempo de tratamento dos pacientes com TB pulmonar ativa.

PACIENTES	IDADE ANOS	GÊNERO	BCG ^a	LESÕES PULMONARES (RAIO X)	TEMPO DE TRATAMENTO (DIAS/MESES) ^b
TB03*	53	M	SIM	ND	0 / 3M / 6M
TB04	48	M	SIM	ND	0
TB06	28	F	SIM	UNILATERAL	6M
TB09	23	F	SIM	UNILATERAL	14 DIAS
TB11*	26	F	SIM	UNILATERAL	7D / 3M / 6M
TB15	48	M	SIM	UNILATERAL	6M
TB26*	56	M	SIM	ND	0 / 3M / 6M
TB28	43	M	NÃO	BILATERAL	3M
TB31	49	M	NÃO	ND	0
TB33	46	M	NÃO	BILATERAL	15 DIAS
TB34	60	F	SIM	UNILATERAL	3M
TB35	58	M	SIM	UNILATERAL	6M
TB37*	23	M	SIM	UNILATERAL	0 / 3M / 6M
TB38**	54	F	NÃO	ND	0 / 3M
TB39**	30	M	SIM	UNILATERAL	0 / 3M
TB40	61	M	SIM	ND	2 DIAS
TB41	48	M	NÃO	BILATERAL	1 DIA
TB42	40	F	SIM	ND	2 DIAS
TB43	45	M	SIM	UNILATERAL	3M
TB44	54	M	SIM	UNILATERAL	6M
TB45*	42	M	SIM	UNILATERAL	15D / 3M / 6M
TB46*	37	F	SIM	ND	0 / 3M / 6M
TB47	23	F	SIM	UNILATERAL	0
TB48*	52	M	SIM	BILATERAL	0 / 3M / 6M

Continuação da tabela.

TB49	24	M	SIM	ND	0
TB50	46	M	SIM	ND	6M
TB51	33	M	NA	ND	3 DIAS
TB52*	41	F	SIM	ND	0 / 3M / 6M
TB53	59	M	NÃO	UNILATERAL	6M
TB55	46	F	SIM	UNILATERAL	3M
TB56	27	M	SIM	UNILATERAL	0
TB57	64	M	SIM	BILATERAL	6M
TB58	27	M	SIM	ND	0
TB59*	53	F	SIM	UNILATERAL	0 / 3M / 6M
TB60*	26	M	SIM	ND	5D / 3M / 6M
TB61*	46	M	SIM	ND	0/ 3M / 6M
TB62	42	M	SIM	ND	3M
TB63	28	M	NÃO	UNILATERAL	3M
TB64	46	M	SIM	BILATERAL	6M
TB65	31	M	NÃO	UNILATERAL	3M

*Foram realizadas três coletas do mesmo paciente: 1ª coleta no início do tratamento, 2ª coleta com 3 meses de tratamento, 3ª coleta com 6 meses de tratamento.

**Foram realizadas 2 coletas do mesmo paciente conforme especificado no tempo de tratamento.

a – Indivíduos que apresentam cicatriz vacinal (BCG).

b – Tempo de tratamento do paciente no momento da coleta.

ND – não determinado.

Tabela 3- Características gerais de indivíduos contatos de pacientes TB ativos diagnosticados com infecção latente (LTBI).

CONTATOS (LTBI) ^a	IDADE (ANOS)	GÊNERO	BCG ^b	PPD (mm) ^c
LTBI10	24	F	SIM	11
LTBI17	32	F	SIM	6
LTBI25	61	F	NÃO	9
LTBI30	25	F	SIM	23
LTBI31	55	M	SIM	22
LTBI32	46	M	SIM	20
LTBI33	31	M	SIM	12
LTBI34	27	M	SIM	20
LTBI35	26	F	SIM	50

a - Contatos TB com infecção latente, teste PPD positivo (n=9).

b - Indivíduos que apresentam cicatriz vacinal.

c – Resultado do teste PPD (Derivado de proteína purificada).

Tabela 4 - Características gerais dos indivíduos controles sadios.

CONTROLE SADIO	IDADE (ANOS)	GÊNERO	BCG^a	PPD (mm)
CS01	39	F	SIM	0
CS02	28	F	SIM	0
CS03	22	F	SIM	6
CS04	21	M	SIM	8
CS05	20	F	SIM	0
CS06	23	M	SIM	10
CS07	24	M	SIM	0
CS08	22	F	SIM	0
CS09	40	F	SIM	4
CS10	27	F	SIM	0
CS11	28	F	SIM	0
CS12	26	F	SIM	13
CS13	25	F	SIM	0
CS14	55	M	SIM	0
CS15	26	F	SIM	0
CS16	23	F	SIM	0
CS17	25	M	SIM	5
CS18	38	F	SIM	13
CS19	24	F	SIM	8
CS20	56	F	SIM	0
CS21	26	F	SIM	1
CS22	22	F	SIM	7
CS23	24	F	SIM	0
CS24	38	F	SIM	0
CS25	32	F	SIM	12
CS26	42	F	SIM	10

a - Indivíduos que apresentam cicatriz vacinal.

3.2 Coleta de sangue, separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), e obtenção de amostras de soro de pacientes TB, contatos TB e controles.

As coletas das amostras de sangue periférico e soros foram realizadas por profissionais previamente treinados. Para a obtenção de PBMC, cerca de 30 ml de sangue venoso foram coletados por punção venosa, usando tubos heparinizados (Vacuette do Brasil). Para a obtenção de soros, outros 10 ml de sangue foram distribuídos em tubos não heparinizados (Vacuette do Brasil). As amostras foram codificadas para preservar o anonimato dos doadores e foram obtidas dos doadores após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O volume de sangue coletado foi diluído 1:2 (vol/vol) em salina tamponada fosfatada (PBS) estéril. A separação 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 1600 rotações por minutos (rpm) e à temperatura ambiente. As células localizadas na interface entre o plasma e o ficoll-paque plus foram coletadas e submetida a duas lavagens (1ª lavagem em PBS: 1500rpm/4°C/10min.; 2ª em meio de cultura RPMI: 1300rpm/4°C/10min.). Em seguida foi realizada a contagem das células 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 obtidas e aliqüotadas 10^6 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 1,8mL (Nunc, Roskilde, Denmark), congelados por um dia no freezer a -70°C e preservadas em nitrogênio líquido até o momento de realização das culturas.

Para obtenção do soro humano, os tubos sem heparina, com o sangue coletado, foram deixados a temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, após a coagulação do sangue, amostras de soro (500 µl) foram coletadas, aliqüotadas e congelados em freezer -20°C até o uso.

3.3 Antígenos

Foram estudados os seguintes antígenos do *M. tuberculosis*: antígenos Mtb DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv1737), antígenos Mtb Rpf (Rv0867, Rv2389), e

antígenos imunodominantes secretados na doença ativa (Rv0717, Rv3353). A proteína de fusão ESAT-6/CFP-10 (representando antígenos imunodominantes do *M. tuberculosis*) foi utilizado como controle positivo no diagnóstico sorológico da TB. À exceção do ESAT-6/CFP-10, antígeno já estudado anteriormente (ABRAMO *et al.*, 2006; MATTOS *et al.*, 2010), a pesquisa com esses novos antígenos é inédita em nosso país. Esses antígenos foram doados pelo Dr. Tom H. M. Ottenhoff, da Leiden University Medical Center, Holanda, colaborador neste trabalho. Os antígenos foram diluídos inicialmente em DMSO (10ul DMSO/mg Ag) e estocados em PBS/ 0,1% DMSO (1mg/ml) a -20 °C, até serem usados nos ensaios.

3.4 Avaliação da resposta humoral

Amostras de soro de pacientes TB e controles foram analisadas pelo teste ELISA indireto de acordo com (De Souza *et al.*, 2005), com modificações. Em resumo, placas de poliestireno, de 96 poços foram sensibilizadas com 2µg/ml (100µl/poço) de antígeno (ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1737, Rv0867, Rv2389) em tampão carbonato/bicarbonato 0,06M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida e, em seguida lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS a 0,15M, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). As amostras de soro foram adicionadas em seguida (100µl/poço, em duplicata) na diluição de 1/20 em PBS-T contendo 10% de soro de cabra. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas e os conjugados anticorpos policlonais anti-IgG (1/1000) e anti-IgG1 (1/500) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), ligados à peroxidase foram adicionados (100µl/poço). Após 1 hora de incubação a 37°C, as placas foram lavadas e o substrato OPD (tampão citrato de sódio/ácido cítrico, pH 5,5 contendo peróxido de hidrogênio e orto-fenilenodiamina) foi adicionado (100µl/poço). Após cerca de 10 minutos houve o desenvolvimento da cor e a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura efetuada em leitor de microplaca (Spectramax-190, Molecular Devices) a 492nm. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), calculado pela fórmula $IE = S / (B + 3SD)$, onde S é igual à média dos valores da densidade óptica em cada amostra, B corresponde a média dos valores das densidades ópticas do branco mais três vezes o desvio padrão (SD).

3.5 Culturas de PBMC estimuladas com antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*

As PBMC 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). 200µl das células foram cultivadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (Millipore, Bedford, MA, USA) em meio RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 µl/mL de aminoácidos não essenciais (todos adquiridos de Gibco, Grand Island, NY, USA) e 10% de plasma humano AB inativado pelo calor. As culturas foram estimuladas com os antígenos recombinantes do *M. tuberculosis*: ESAT-6/CFP-10 (5 µg/mL), Rv1733 (5 µg/mL), Rv2029 (5 µg/mL). As culturas de células foram mantidas à 37°C, em estufa com 5% de CO₂ por 4 dias para detecção das quimiocinas e citocinas. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -20°C.

3.6 ELISA para detecção de IFN-γ

O método imunoenzimático, ELISA, foi utilizado para quantificar a secreção de IFN-γ por PBMC de pacientes TB, contatos e controles sadios. Resumidamente, placas de 96 poços maxisorp (Nunc, Roskilde, Denmark) foram cobertas com 100µl/poço de anticorpo monoclonal anti-IFN-γ humano (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) em tampão carbonato por 16 horas à 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas com PBS-Tween e bloqueadas com 200µl/poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino (PBS/SFB 10%, Gibco, Grand Island, N.Y., USA) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas em PBS-Tween e as amostras, bem como os padrões da curva foram aplicados a cada poço e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas. Terminada a incubação, as placas foram lavadas com PBS-Tween e foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), juntamente com o conjugado estreptavidina-peroxidase (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) diluído em PBS/SFB 10% com incubação das placas por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram novamente lavadas, e a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) e incubação por 20 minutos

ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura imediatamente realizada em leitor de placas (Spectramax-190, Molecular Devices) a 450nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir da curva-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos padrões.

3.7 ELISA para detecção de CXCL-10

A concentração da quimiocina CXCL-10 foi avaliada no sobrenadante das culturas de PBMC pelo método de ELISA indireto, conforme descrito pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, USA). Brevemente, placas de 96 poços maxisorp (Nunc, Roskilde, Denmark) foram cobertas com 100µl/poço de anticorpo de captura anti-CXCL-10 humano (R&D Systems, Minneapolis, USA) diluídos em PBS por 16 horas à 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas com PBS-Tween e bloqueadas com 200µl/poço de uma solução de PBS contendo 1% de BSA (PBS/BSA 1%) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas em PBS-Tween e as amostras, bem como os padrões da curva foram aplicados a cada poço e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas. Terminada a incubação, as placas foram lavadas com PBS-Tween. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado (R&D Systems, Minneapolis, USA) diluído em PBS/BSA 1% e as placas incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram novamente lavadas e o complexo detector formado pelo conjugado estreptavidina-peroxidase adicionado, e as placas incubadas por mais 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) e incubação por 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura imediatamente realizada em leitor de placas (Spectramax-190, Molecular Devices). As quantidades de quimiocinas foram calculadas a partir da curva-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos padrões.

3.8 Detecção da produção de citocinas e quimiocinas pelo método CBA

Amostras de 25 µl dos sobrenadantes de cultura ou soro foram usadas para quantificação da produção de quimiocinas e citocinas usando o método "cytometric

bead array” (CBA). Os reagentes usados nesta etapa são provenientes dos kits (“Human chemokine – kit I” e “Human Th1/Th2 cytokine kit II”) adquiridos da Becton Dickinson. As amostras receberam 5µl de cada reagente, para marcar a produção de cada quimiocina (CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) e citocina (IFN-γ, TNF-α, IL-17, IL-10 e IL-4), juntamente com 25µl do reagente revelador. Em seguida, foram submetidas a incubação de 3h a temperatura ambiente, protegidas da luz. Em seguida as placas foram lavadas com 200 µl de reagente F e centrifugadas a 1050 rpm durante 5 minutos. Em cada tubo os sobrenadantes provenientes dessa centrifugação foram aspirados, restando aproximadamente 50 µl de amostras marcadas. Em cada tubo foram colocados 100 µl de reagente F para leitura no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson). Após a leitura de padrões e amostras, os dados foram analisados no software BD CBA Isotype Analysis (Becton Dickinson), onde os valores são representados em concentração (pg/ml) de cada quimiocina e citocina.

3.9 Receiver Operating Characteristic Curve - Curva ROC

Neste estudo, utilizou-se a *receiver operating characteristic curve*, conhecida como curva ROC, para análise dos valores de acurácia – área sob a curva ROC, sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança. As curvas foram obtidas utilizando-se programa estatístico MedCalc Statistical - versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html). Os grupos de pacientes utilizados para a realização da curva ROC, foi o grupo de pacientes com tuberculose ativa, 33 pacientes sem tratamento prévio ou com até 15 dias de tratamento, que ainda mantém baciloscopia positiva e o grupo de pacientes com 1-3 meses de tratamento com 46 pacientes.

A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro positivo) no eixo vertical e do complemento da especificidade (taxa de falso positivo) no eixo horizontal. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte¹, determinando assim a área sob a curva (ASC). A ASC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior ASC, o que significa mais próximo do valor 1, melhor é o desempenho do método avaliado (Medronho R.A.; Carvalho, 2003; Mineo, 2005).

¹ Pontos de corte são valores normativos, acima dos quais um teste é considerado positivo e abaixo dos quais o teste é considerado negativo.

A curva ROC além de indicar a acurácia global dos testes avaliados permitiu identificar com precisão o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos do teste. Cada ponto do gráfico representa também os índices de sensibilidade e (100 – especificidade) de um ponto de corte estabelecido. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidades.

Outra forma pela qual avaliamos os testes foi através do cálculo da razão de verossimilhança (likelihood ratio). A razão de verossimilhança é definida como a razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença. Para um teste dicotômico (positivo/negativo), a razão de verossimilhança é calculada para o resultado positivo e para o resultado negativo. A razão de verossimilhança positivo (RV+) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas saudáveis, e a razão de verossimilhança negativo (RV-) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas saudáveis. Além da sensibilidade, especificidade, RV+ e RV-, também analisamos o valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos testes avaliados (Medronho R.A.; Carvalho, 2003).

3.10 Análise estatística

A comparação das médias entre os grupos foi realizada, para cada antígeno, através do teste não paramétrico Mann Whitney *U*, como apropriado. Para testar a significância das diferenças entre as curvas ROC dos vários antígenos, foi utilizado o teste de Wilcoxon, pelo MedCalc Statistical (Versão 5.00.020, Brussels, Belgium), como apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 de pacientes com tuberculose frente a diferentes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, influência do tratamento quimioterápico.

Trabalhos realizados anteriormente mostraram a predominância de anticorpos IgG1 no soro de pacientes com TB (RUSSAIN et al, 1995; GUPTA et al, 2005; MATTOS et al., 2010). No presente estudo, a reatividade de anticorpos IgG1 provenientes de pacientes TB em diferentes etapas do tratamento quimioterápico foi avaliada frente a antígenos da fase de latência ou antígenos DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1737), antígenos da fase de reativação da doença ou antígenos Rpf (Rv0867, Rv2389) e antígenos da fase de multiplicação ativa do *M. tuberculosis* (ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353). Foram estudados os seguintes grupos de pacientes TB: (i) pacientes com tuberculose ativa (n = 34); (ii) pacientes que completaram 1 a 3 meses de quimioterapia (n = 46); (iii) pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (n = 20); e (iv) pacientes após um ano de tratamento (n=6).

Os resultados mostram (Figura 2) que pacientes na fase ativa da TB pulmonar (0M-TB) apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG1 contra os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867, em comparação com o controle sadio ($p < 0,001$). Tais valores permaneceram elevados após o início do tratamento (1-3M), exceto para o antígeno Rv2029. Após completado 6 meses de quimioterapia, a resposta de IgG1 frente aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv3353, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 foi reduzida a níveis comparáveis àqueles obtidos pelo grupo controle ($p < 0,01$). Além disso, um ano após o tratamento, os níveis de anticorpos foram ainda mais baixos e não diferiram do grupo controle (Figura 2). Interessantemente, os antígenos Rv0717 e Rv1733 induziram um pico de resposta de IgG1 após 1-3 meses de quimioterapia ($p < 0,01$), sugerindo que o início do tratamento quimioterápico favorece a uma maior resposta de anticorpos IgG1 contra esses antígenos. Não foi detectado aumento significativo nos níveis de anticorpos IgG1 contra os antígenos Rv1737 e Rv2389 no soro de pacientes TB, não havendo diferença entre os grupos avaliados. Em conjunto, esses resultados sugerem que os

antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867, relacionados a diferentes fases da infecção pelo *M. tuberculosis* podem ser utilizados no diagnóstico da TB pulmonar, havendo maior reatividade de anticorpos IgG1 na fase ativa da TB e após o início da quimioterapia. A diminuição nos níveis de anticorpos IgG1 frente a esses antígenos em pacientes após completada a quimioterapia sugere sua possível aplicação no monitoramento do tratamento.

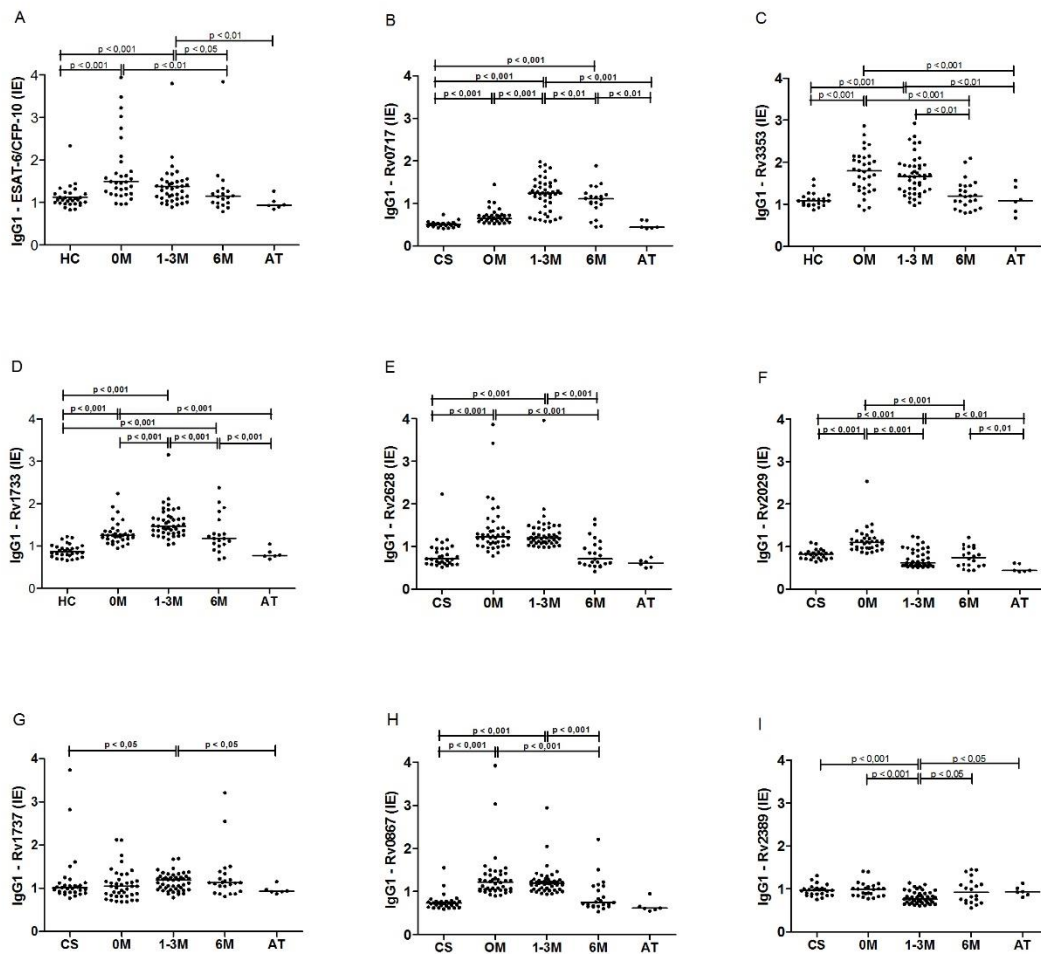


Figura 2 - Níveis séricos de anticorpos IgG1 contra antígenos do *M. tuberculosis*. Foram testados os antígenos ESAT-6/CFP-10 (A), Rv0717 (B), Rv3353 (C), Rv1733 (D), Rv2628 (E), Rv2029 (F), Rv1737 (G), Rv0867 (H) e Rv2389 (I). Foram avaliados os grupos: pacientes com tuberculose pulmonar ativa (OM, n=34); pacientes com 1 a 3 meses de quimioterapia (1-3M, n=46); pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (6M, n=20); pacientes após um ano de tratamento (AT, n=6), grupo controle sadio (CS, n=20). O soros foram avaliados na diluição 1/20. A barra horizontal representa a mediana. IE = índice ELISA.

4.2 Análise das curvas ROC para os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1737, Rv0867 e Rv2389 empregados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) no diagnóstico da tuberculose.

A análise da curva ROC foi realizada para avaliar a acurácia dos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1737, Rv0867, Rv2389 no diagnóstico da TB. A acurácia do teste é representada pela avaliação da área sob a curva ROC (ASC) e dos valores de sensibilidade e especificidade, bem como as razões de verossimilhança positiva e negativa. O Elisa com a proteína de fusão ESAT-6/CFP-10, antígeno imunodominante empregado em testes de diagnóstico da TB, foi considerado como um controle positivo. Avaliando a reatividade de anticorpos IgG1 no grupo de pacientes com TB ativa (0M), os resultados mostram que o valor da área sob a curva (ASC), foi igual a 0,977 para o antígeno Rv1733 (95% CI: 0,895-0,997), sendo significativamente maior em comparação com o valor da ASC de ESAT-6/CFP-10 (ASC = 0,893, 95% CI: 0,782-0,959). Já os valores da ASC dos antígenos Rv0717, Rv3353, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 não apresentaram diferença em comparação ao ESAT-6/CFP-10 (Figura 3). Interessantemente, quando avaliamos os valores da ASC obtidos do grupo com um a três meses tratamento (1-3M) o antígeno Rv1733 teve melhor desempenho, tendo ASC igual a 0,994 (95% CI: 0,936-1,000), sendo este valor maior que o da ASC do antígeno ESAT-6/CFP-10 (AUC = 0,790, 95% CI: 0,68- 0,887) ($P < 0.001$). Neste mesmo estágio de infecção (1-3M), com exceção do antígeno Rv2029, os demais antígenos Rv0717, Rv3353, Rv2628 e Rv0867 também apresentaram a ASC maior que a apresentada por ESAT-6/CFP-10 (Figura 4).

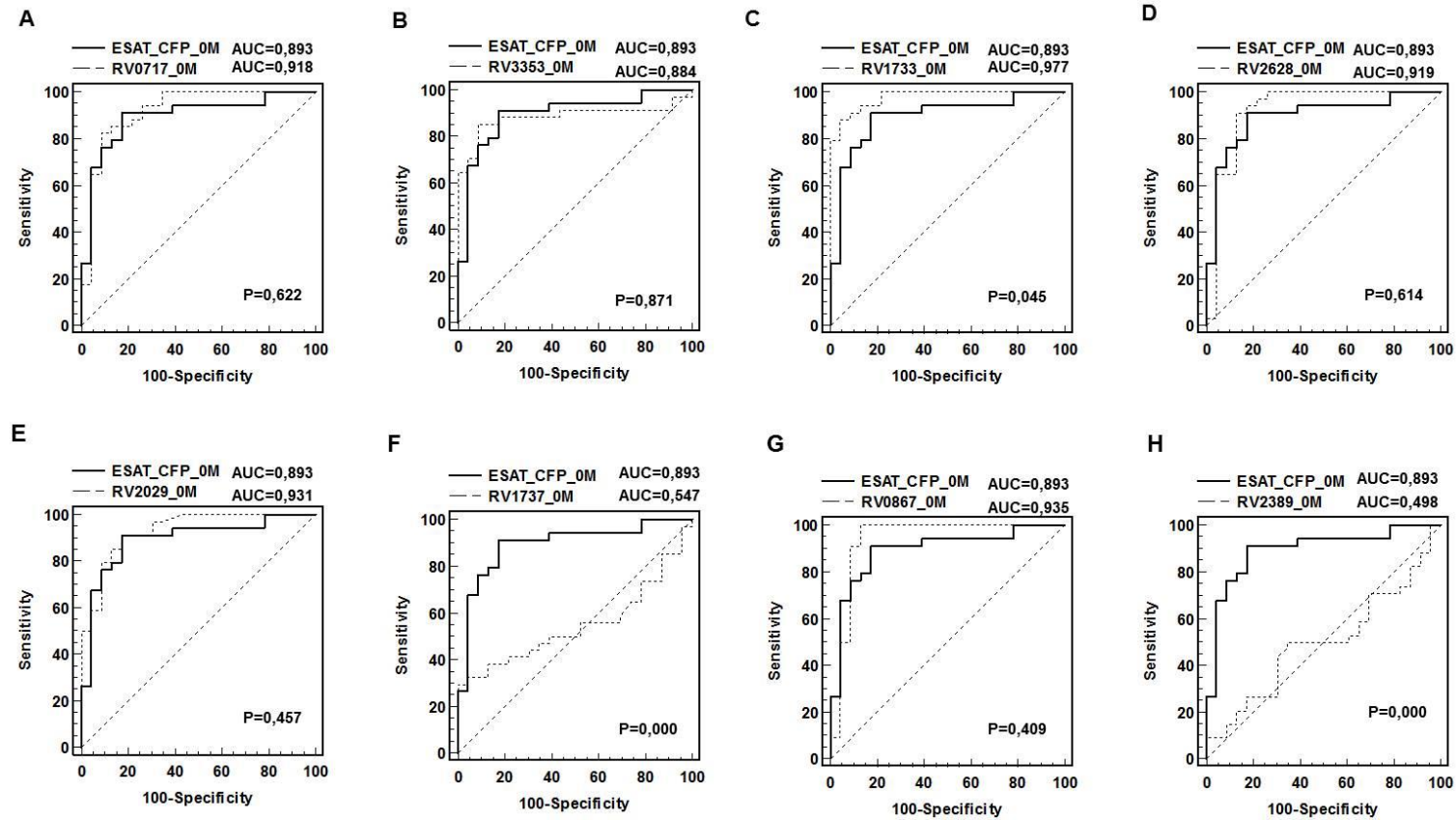


Figura 3 - Comparação de antígenos do *M. tuberculosis* através da análise da curva ROC utilizando soro de pacientes com TB ativa. Foram utilizados os resultados do ELISA-IgG1 referentes ao grupo de pacientes com tuberculose ativa. As curvas ROC foram analisadas para comparar o desempenho dos antígenos ESAT-6/CFP-10 versus: Rv0717(A), Rv3353(B), Rv1733(C), Rv2628 (D), Rv2029 (E), Rv1737 (F), Rv0867 (G) e RV2389 (H) no diagnóstico da Tuberculose.

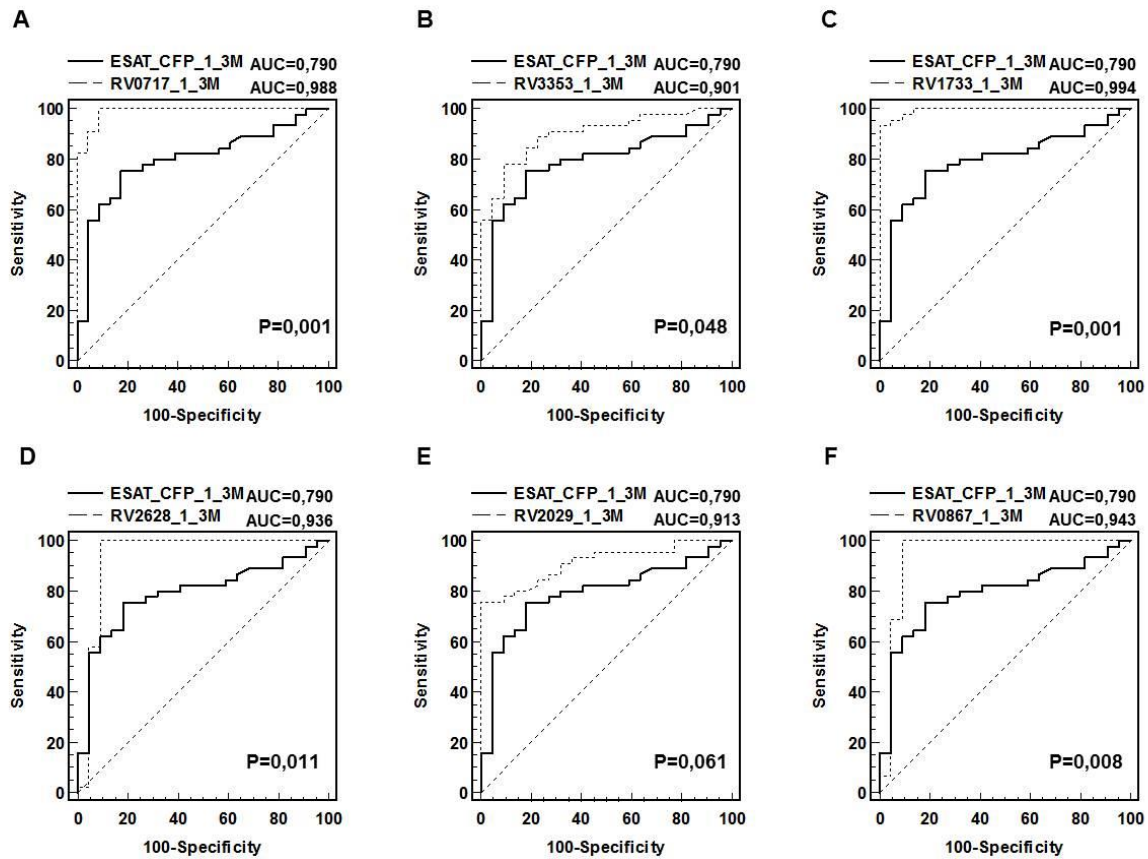


Figura 4 - Comparação de antígenos do *M. tuberculosis* através da análise da curva ROC utilizando soro de pacientes com 1-3 meses de tratamento. Comparação dos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 através da curva ROC. Foram utilizados os resultados do ELISA-IgG1 obtidos no grupo de pacientes que receberam 1 a 3 meses de quimioterapia. As curvas ROC foram realizadas para comparar o desempenho dos antígenos ESAT-6/CFP-10 versus: Rv0717(A), Rv3353 (B), Rv1733 (C), Rv2628 (D), Rv2029 (E) e Rv0867 (F) no diagnóstico da Tuberculose.

4.3 Sensibilidade e especificidade de antígenos das fases de latência (DosR), reativação e de fase ativa da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* no diagnóstico da tuberculose.

A sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA avaliados através da curva ROC, mostrou que os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1737, Rv0867 e Rv2389, testados com soros de pacientes TB na fase ativa da doença (0M), apresentaram sensibilidade de 91%, 82%, 85%, 88%, 91%, 91%, 29%, 100% e 47% respectivamente, e especificidade de 82%, 91%, 90%, 95%, 87%, 82%, 95%, 87%, e 65%, respectivamente. Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%. Em termos de razão de verossimilhança (RV), os valores foram 5,24, 9,47, 9,38, 20,29, 6,99, 5,24, 7,44, 7,67 e 1,35, respectivamente, para razão de verossimilhança positiva e 0,11, 0,19, 0,16, 0,12, 0,10, 0,11, 0,71, 0,00 e 0,81, respectivamente, para razão de verossimilhança negativa (Tabela 5). Com relação a análise do valor preditivo dos respectivos antígenos testados, os valores observados foram 88%, 93%, 93%, 96%, 91%, 88%, 91%, 92% e 66%, respectivamente, para valor preditivo positivo (VPP) e 84%, 75%, 78%, 82%, 85%, 80%, 44%, 100% e 42%, respectivamente, para valor preditivo negativo (VPN) (Tabela 5). Desta forma, à exceção dos antígenos Rv1737 e Rv2389, os demais antígenos mostraram valores de sensibilidade e especificidade próximos ao apresentado pelo ESAT-6/CFP-10. O mesmo tipo de análise da curva ROC foi realizada utilizando-se soros de pacientes no estágio de 1-3M de tratamento. Os resultados na Tabela 6 mostram que os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 apresentaram sensibilidade de 75%, 100%, 77%, 95%, 100%, 75% e 100% respectivamente, e especificidade de 81%, 90%, 90%, 95%, 90%, 90% e 90%, respectivamente. Em termos de razão de verossimilhança (RV), os valores foram 4,16, 11,0, 8,56, 21,02, 11,0, 8,31 e 11,0, respectivamente, para razão de verossimilhança positiva e 0,30, 0,0, 0,24, 0,05, 0,0, 0,27 e 0,0, respectivamente, para razão de verossimilhança negativa. Com relação a análise do valor preditivo dos respectivos antígenos testados, os valores observados foram 86%, 100%, 92%, 96%, 100%, 96% e 100%, respectivamente, para valor preditivo positivo (VPP) e 66%, 94%, 69%, 90%, 94%, 70% e 94%, respectivamente, para valor preditivo negativo (VPN). Os dados obtidos (91% sensibilidade e 83%

especificidade) confirmam a boa performance de ESAT-6/CFP-10 na fase ativa da doença (0M), como previamente demonstrado por nosso grupo (MATTOS et al., 2010) e sugere que a detecção de anticorpos IgG1 contra os antígenos Rv0717, Rv1733, Rv3353, Rv0867, Rv2628 e Rv2029 tem potencial aplicação no diagnóstico da TB. Além disso, os níveis elevados de anticorpos no soro de pacientes com 1-3M de quimioterapia contra os antígenos Rv0717, Rv1733, Rv2628 e Rv0867 podem ser considerados como potenciais biomarcadores para monitorar o resultado do tratamento da tuberculose.

Tabela 5 - Sensibilidade e especificidade dos antígenos do *M. tuberculosis* expressos na fase ativa (ESAT-6/CFP-10, Rv0717 e Rv3353), antígenos DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv1737), antígenos Rpf (Rv0867 e Rv2389) no sorodiagnóstico da tuberculose.

Antígenos	Cutoff ^a	Sensibilidade ^b	Especificidade ^b	VPP ^c	VPN ^c	RV+ ^d	RV- ^d	ASC
<i>Antígenos de fase ativa</i>								
ESAT-6/CFP-10	1,125	91,2	82,6	88,6	84,2	5,24	0,11	0,893
Rv0717	0,566	82,4	91,3	93,3	75	9,47	0,19	0,918
Rv3353	1,273	85,3	90,9	93,5	78	9,38	0,16	0,884
<i>Antígenos DosR</i>								
Rv1733	1,083	88,2	95,7	96,7	82,6	20,29	0,12	0,977
Rv2628	0,947	91,2	87,0	91,2	85	6,99	0,10	0,919
Rv2029	0,901	91,2	82,6	88,2	80	5,24	0,11	0,931
Rv1737	0,860	29,4	95,7	91	44	6,76	0,74	0,547
<i>Antígenos Rpf</i>								
Rv0867	0,846	100,0	87,0	92	100	7,67	0,00	0,935
Rv2389	0,989	47,1	65,2	66,6	42	1,35	0,81	0,498

a, b - O cutoff, sensibilidade e especificidade foram determinados com base na análise da curva ROC.

b - Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%.

c - VPP e VPN – correspondem ao valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, respectivamente em %.

d - RV+ e RV- correspondem a razão de verossimilhança positivo e negativo, respectivamente. ASC = área sob a curva.

Tabela 6 - Sensibilidade e especificidade dos antígenos expressos na fase ativa ESAT-6/CFP-10, Rv0717 e Rv3353, antígenos DosR Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv1737, antígenos Rpf Rv0867 e Rv2389 no sorodiagnóstico da tuberculose após 1-3 meses de tratamento.

Antígenos	Cutoff ^a	Sensibilidade ^b	Especificidade ^b	VPP ^c	VPN ^c	RV+ ^d	RV- ^d	ASC
<i>Antígenos de fase ativa</i>								
<i>ESAT-6/CFP-10</i>	1,125	75,6	81,8	86,6	66,6	4,16	0,30	0,790
<i>Rv0717</i>	0,566	100,0	90,9	100	94,4	11,00	0,00	0,988
<i>Rv3353</i>	1,273	77,8	90,9	92,8	69,2	8,56	0,24	0,901
<i>Antígenos DosR</i>								
<i>Rv1733</i>	1,083	95,6	95,5	96,9	90,4	21,02	0,05	0,994
<i>Rv2628</i>	0,947	100,0	90,9	100	94,4	11,00	0,00	0,936
<i>Rv2029</i>	0,867	75,6	90,9	96,2	70,3	8,31	0,27	0,913
<i>Antígenos Rpf</i>								
<i>Rv0867</i>	0,938	100,0	90,9	100	94,4	11,00	0,00	0,943

a, b - O cutoff, sensibilidade e especificidade foram determinados com base na análise da curva ROC.
b - Os valores de sensibilidade e especificidade apresentados foram aqueles correspondentes ao ponto da curva ROC mais próximo do ponto de sensibilidade e especificidade igual a 100%.
c - VPP e VPN – correspondem ao valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, respectivamente, em %.
d - RV+ e RV- correspondem a razão de verossimilhança positivo e negativo, respectivamente. ASC = área sob a curva.

4.4 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG de pacientes com tuberculose ativa, contatos de pacientes TB e controles sadios, frente a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Antígenos DosR (Rv1733, Rv2628 e Rv2029) e antígenos da fase ativa da infecção pelo *M. tuberculosis* (ESAT-6/CFP-10 e Rv0717) foram selecionados para a avaliação da reatividade de anticorpos IgG de indivíduos com TB latente em comparação a controles sadios e pacientes com TB ativa. Para tanto, foram avaliados os seguintes grupos: (i) pacientes com tuberculose ativa (n=20); (ii) grupo infecção latente formado por contatos de pacientes TB (n=9); (iii) grupo controle formado por indivíduos sadios PPD negativos (n=16).

Como previamente demonstrado por nosso grupo (MATTOS et al., 2010), os resultados apresentados mostram níveis elevados de anticorpos IgG contra o antígeno ESAT-6/CFP-10 no soro de pacientes com TB pulmonar ativa (0M TB) quando comparado com o grupo controle sadio ($p < 0,001$, Figura 5A). Níveis séricos aumentados de anticorpos IgG também foram observados contra o antígeno de fase ativa Rv0717 e contra os antígenos DosR Rv1733 e Rv2029, em comparação aos níveis observados no grupo controle ($p < 0,05$, Figura 5B, C e D). Não foi observado aumento significativo de anticorpos IgG específicos para o antígeno Rv2628 nos grupos estudados (Figura 5E). Interessantemente, níveis elevados de IgG contra o antígeno ESAT-6/CFP-10 e contra o antígeno DosR Rv1733 foram observados no soro de indivíduos com infecção latente (LTBI) quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, para o antígeno ESAT-6/CFP-10, houve diferença entre os grupos TB e LTBI (Fig.5A, $p < 0,05$). O mesmo não foi observado para o antígeno DosR Rv1733, onde os grupos TB ativa (0M) e LTBI não diferiram (Figura 5C).

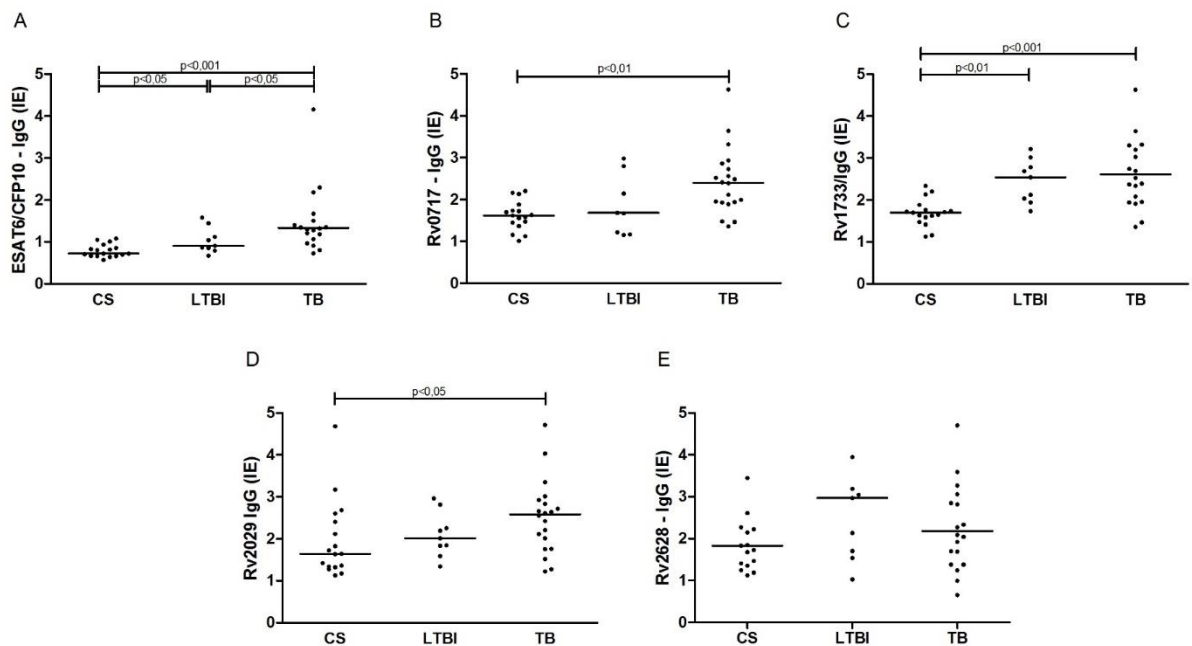


Figura 5 - Níveis séricos de anticorpos IgG contra os antígenos de fase ativa e antígenos de fase de latência no soro de contatos TB com infecção latente. Antígenos DosR ESAT-6/CFP-10 (A) e Rv0717 (B) e antígenos DosR Rv1733 (C), Rv2628 (D), Rv2029 (E). Foram avaliados os grupos: controle sadio, PPD negativo (CS; n=16); contatos TB - infecção latente, PPD positivo, (LTBI; n=9), e grupo de pacientes com tuberculose ativa (TB; n = 20). IE = índice ELISA.

4.5 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 de pacientes com tuberculose ativa, contatos TB e controles sadios frente a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

A reatividade de anticorpos IgG1 frente a antígenos DosR (Rv1733, Rv2628 e Rv2029) e antígenos da fase ativa da infecção pelo *M. tuberculosis* (ESAT-6/CFP-10 e Rv0717) foi avaliada em pacientes com TB ativa e TB latente (contatos TB) em comparação ao grupo controle sadio PPD negativo. A figura 6 (6A, 6C e 6D) mostra a presença de níveis aumentados ($p < 0,05$) de anticorpos IgG1 contra a molécula híbrida ESAT-6/CFP-10 e contra os antígenos Rv1733 e Rv2029 no soro de pacientes com TB pulmonar ativa em comparação com os níveis encontrados no grupo controle ($p < 0,05$). Interessantemente, o grupo de indivíduos contatos TB apresentou níveis elevados de anticorpos IgG1 específicos para os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029, em relação ao grupo controle sadio (Figura 6A, C e D). A resposta de IgG1 frente ao antígeno de fase ativa Rv0717 foi maior no grupo de pacientes com TB ativa, em comparação ao grupo de contatos TB ($p < 0,05$, Figura 5B). Com relação ao antígeno de fase de latência Rv2628, não houve diferença entre os grupos estudados (Figura 6E).

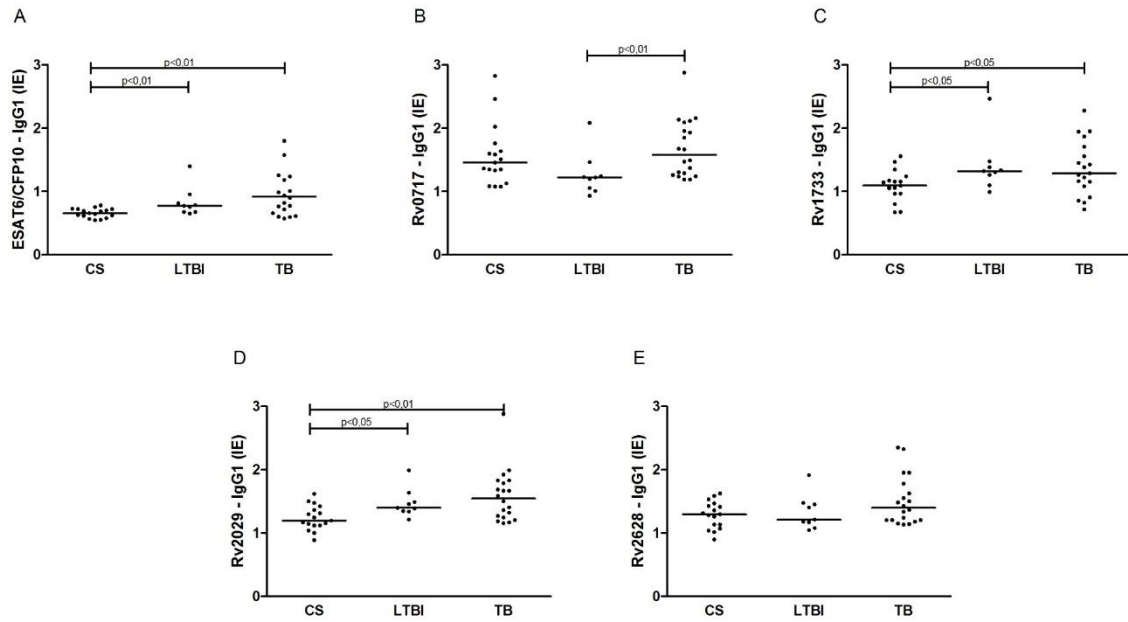


Figura 6 - Níveis séricos de anticorpos IgG1 contra os antígenos de fase ativa e antígenos de fase de latência no soro de contatos TB com infecção latente. Níveis séricos de anticorpos IgG1 contra os antígenos de fase ativa, ESAT-6/CFP-10 (A) e Rv0717 (B), e antígenos DosR Rv1733 (C), Rv2628 (D), Rv2029 (E). Foram avaliados os grupos: controle sadio PPD negativo (CS; n=16); contatos TB PPD positivo, (LTBI; n=9), e pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB; n=20). IE = índice ELISA.

4.6 Produção de IFN- γ e CXCL-10 em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029 em pacientes com TB ativa comparado com indivíduos contatos TB com diagnóstico de infecção latente.

Constatada a presença de anticorpos IgG e IgG1 no soro de pacientes com TB ativa e em contatos TB PPD positivos (com diagnóstico de infecção latente), foi avaliado nesses grupos a produção de IFN- γ e CXCL-10 por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com os antígenos ESAT-6/CFP-10 (representando a fase ativa da infecção) e os antígenos Rv1733 e Rv2029 (da fase de latência). Esses antígenos foram selecionados e estudados por terem apresentado melhor desempenho nos ensaios sorológicos anteriores. Foram avaliados os seguintes grupos: (i) pacientes com tuberculose ativa (n=8); (ii) contatos TB (n=8); (iii) indivíduos controle sadio PPD negativos (n=8).

Os resultados mostram uma produção significativa de IFN- γ pelos grupos TB ativa e LTBI em comparação com o grupo controle sadio em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10 ($p < 0,05$, Figura 7). Para o antígeno de fase de latência Rv1733 foi observada uma produção elevada de IFN- γ pelo grupo LTBI, sendo significativamente maior em relação aos grupos CS e TB ativa ($p < 0,05$, Figura 7). Com relação ao antígeno Rv2029 não houve diferença significativa entre os grupos estudados, havendo somente uma tendência do grupo LTBI apresentar maior produção de IFN- γ quando comparado com os grupos CS e TB ativa (Figura 7). Interessantemente, apesar de não haver diferença significativa na produção de CXCL-10, os grupos demonstraram um perfil de resposta bem semelhante ao apresentado pela produção de IFN- γ (Figuras 7 e 8). Os grupos TB ativa e LTBI mostraram uma tendência em produzir maior quantidade de CXCL-10 em comparação ao grupo CS quando estimulados com ESAT-6/CFP-10. Além disso, para os antígenos DosR Rv1733 e Rv2029 houve uma tendência do grupo LTBI produzir maior quantidade de CXCL-10 quando comparado com os demais grupos (Figura 8). Conforme esperado, a produção de IFN- γ e CXCL10 foi maior após estimulação com o mitógeno PHA, nos três grupos avaliados.

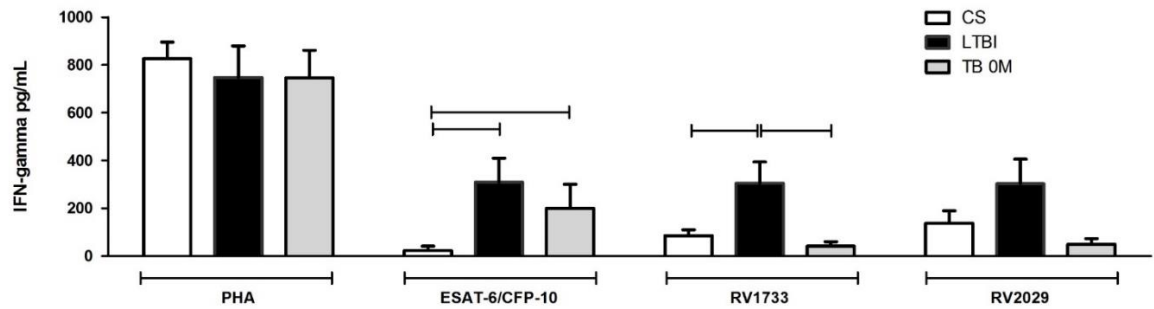


Figura 7 - Avaliação da produção de IFN- γ por PBMC em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029. Foram estudados os grupos: controle sadio PPD negativo (CS; n=8); contatos TB PPD positivos ou grupo infecção latente (LTBI; n=8), e grupo de pacientes com tuberculose ativa (TB OM; n = 8).

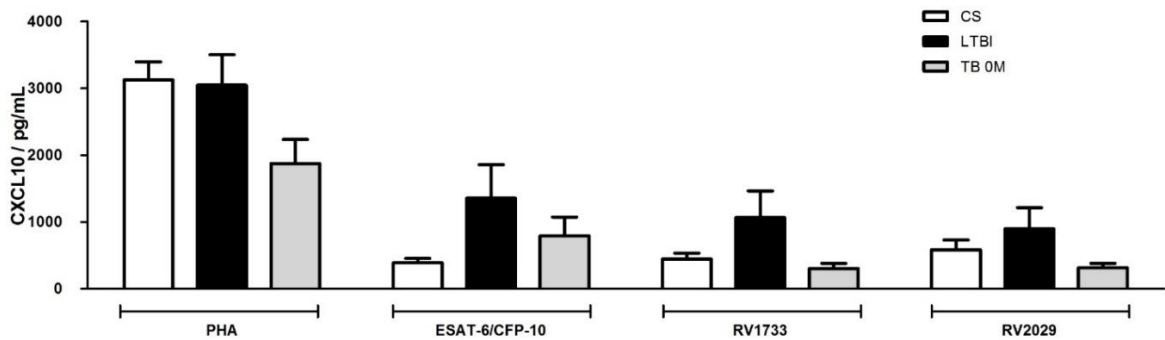


Figura 8 - Avaliação da produção de CXCL-10 por PBMC em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029. Foram estudados os grupos: controle sadio PPD negativo (CS; n=8); contatos TB PPD positivos ou grupo infecção latente (LTBI; n=8), e grupo de pacientes com tuberculose ativa (TB OM; n = 8).

4.7 Produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) após estimulação com os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029, em pacientes com tuberculose em diferentes etapas do tratamento quimioterápico.

A produção de IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e IL-4 em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10 (representando a fase ativa da infecção) e frente aos antígenos Rv1733 e Rv2029 (da fase de latência), foi avaliada no sobrenadante de culturas (PBMC) usando o método de CBA. Nesse ensaio foram avaliados os seguintes grupos: (i) pacientes com tuberculose ativa (n=10); (ii) pacientes com 3 meses de quimioterapia (n=10); (iii) pacientes com 6 meses de quimioterapia (n=10); e, (iv) indivíduos controle sadio (n=10). A figura 9 mostra que a produção de IFN- γ e TNF- α foi elevada no grupo de pacientes com TB ativa em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10, em comparação ao grupo CS ($p<0,05$). Tais valores de IFN- γ e TNF- α permaneceram elevados após três meses de tratamento. Após seis meses de tratamento o grupo TB ativa mostrou níveis de IFN- γ e TNF- α similares àqueles observado no grupo controle sadio. Interessantemente, os antígenos Rv1733 e Rv2029 induziram um pico de resposta de IFN- γ após três meses de quimioterapia em comparação com o grupo TB ativa ($p<0,05$). Em contraste, os antígenos Rv1733 e Rv2029 foram capazes de estimular alta produção de TNF- α somente em pacientes com três meses de quimioterapia em comparação com o grupo controle sadio ($p<0,05$). Os grupos estudados não diferiram na produção de IL-17, IL-10 e IL-4. Confirmando uma polarização de uma resposta para o perfil Th1 (Figura 9).

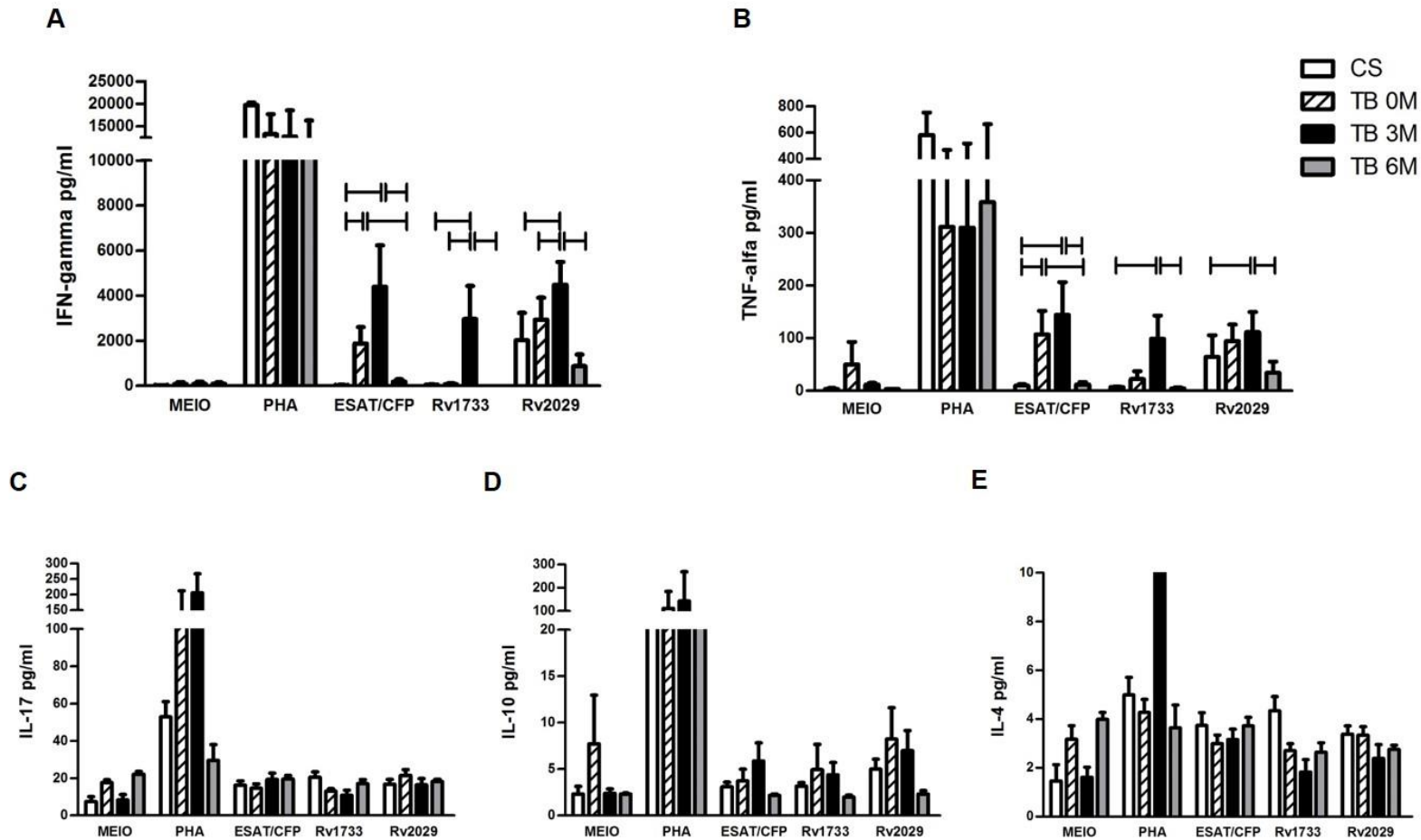


Figura 9 - Produção de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-17 (C), IL-10 (D) e IL-4 (E) por PBMC após estimulação com ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029. Foram estudados os grupos: controle sadio (CS; n=10); pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB 0M; n=10); pacientes com 1 a 3 meses de quimioterapia (TB 1-3M; n=10); pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (TB 6M; n=10). Diferença estatística ($p < 0,05$).

4.8 Níveis de quimiocinas e IFN- γ no soro de pacientes com TB ativa em diferentes etapas do tratamento e em contatos TB com diagnóstico de infecção latente.

Visando detectar biomarcadores de infecção ativa e latente na tuberculose, foram investigados os níveis de quimiocinas CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 no soro de indivíduos com diagnóstico de infecção latente e em pacientes com TB pulmonar em diferentes estágios de tratamento, usando o método CBA. Foram avaliados os seguintes grupos: (i) pacientes com tuberculose ativa, iniciando o tratamento (n=20); (ii) pacientes com 3 meses de quimioterapia (n=20); (iii) pacientes com 6 meses de quimioterapia (n=20), (iv) indivíduos com infecção latente (n=10); (v) indivíduos controle sadio PPD negativos (n=17) (Figura 10). Além disso, em um estudo longitudinal, amostras de soro de dez pacientes com TB ativa foram avaliadas quanto aos níveis de quimiocinas por CBA, antes do tratamento e após completado seis meses de quimioterapia (Figura11).

Os resultados mostram que os pacientes com TB ativa no início de tratamento (TB 0M) apresentaram níveis significativos de CXCL9 e CXCL10 em relação aos grupos CS e LTBI ($p < 0,05$), além disso, os níveis tanto de CXCL10 como os níveis de CXCL9 diminuíram significativamente após 6 meses de tratamento em relação ao grupo com TB ativa ($p < 0,05$) (Figura 10A e B, Fig.11). Não foram observadas diferenças nos níveis de CXCL9 e CXCL10 entre os grupos CS e LTBI (Figuras 10 – A e B). Os níveis de CXCL8 foram também mais elevados no grupo com TB ativa, em comparação ao grupo CS ($p < 0,05$), no entanto, esses níveis se mantiveram após seis meses de tratamento (TB 6M). Interessantemente, o grupo LTBI apresentou níveis significativos de CXCL-8 quando comparado com o grupo CS ($p < 0,05$) (Figura 10C). Com relação aos níveis séricos de CCL2, não houve diferença entre os grupos (Figura 10D).

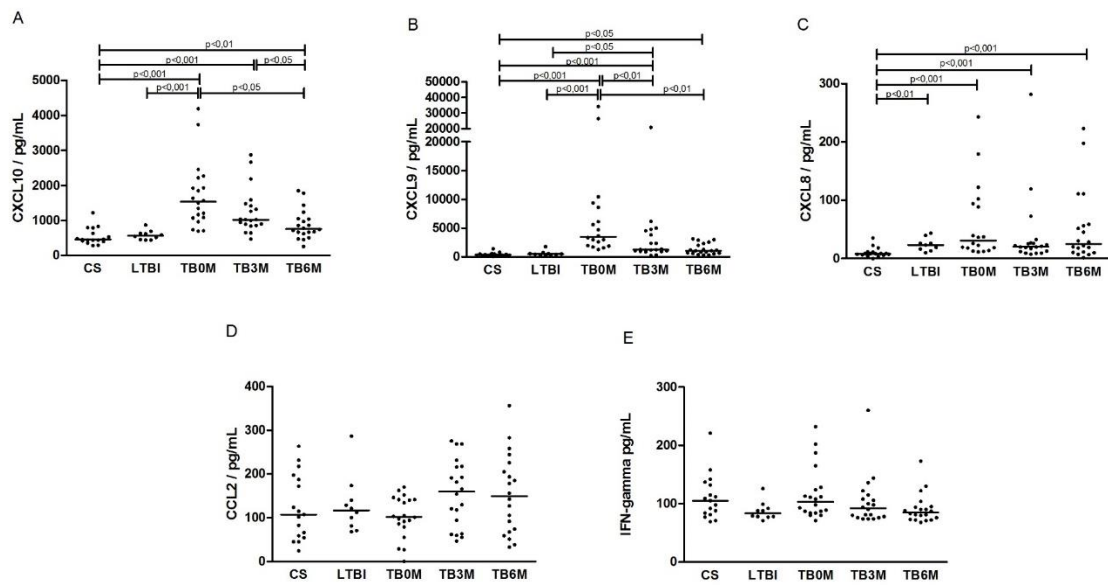


Figura 10 - Níveis séricos de CXCL-10 (A), CXCL-9 (B), CXCL-8 (C), CCL-2 (D) e IFN- γ (E) em pacientes com tuberculose e contatos TB. CS = grupo controle sadio PPD negativo (n=17); LTBI = contatos de pacientes TB ou indivíduos com infecção latente PPD positivos (n=10), TB0M = pacientes com tuberculose pulmonar ativa, (n = 20), TB3M = pacientes que completaram três meses de tratamento, (n = 20), e TB6M = pacientes que completaram 6 meses de tratamento (n = 20).

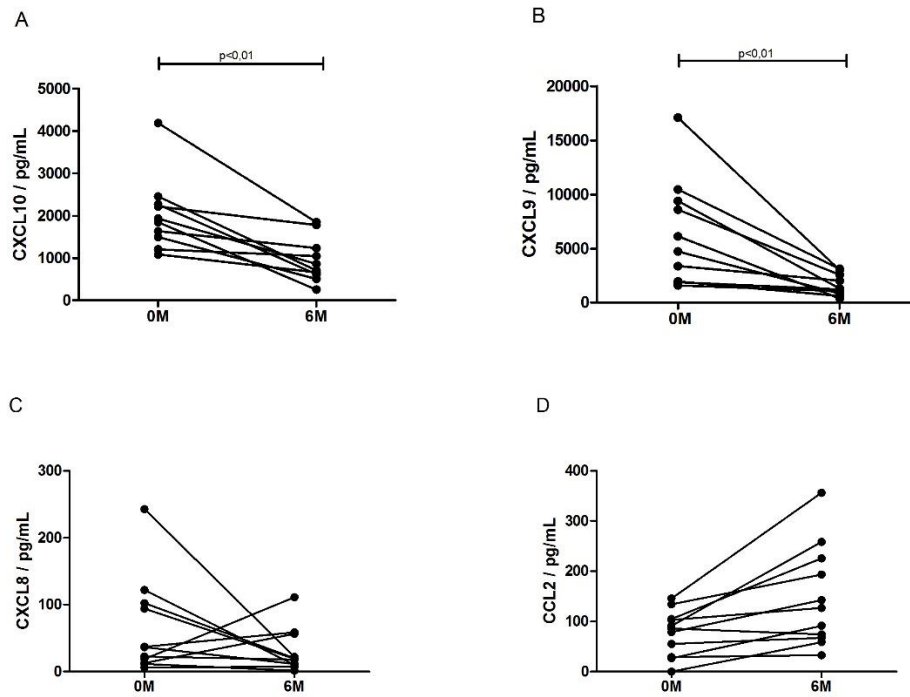


Figura 11 - Níveis séricos de CXCL-10 (A), CXCL-9 (B), CXCL-8 (C) e CCL-2 (D) em pacientes TB antes e após completado o tratamento. 0M = pacientes com tuberculose pulmonar ativa (n=10), 6M = pacientes que completaram 6 meses de tratamento (n=10).

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce e o tratamento regular são medidas fundamentais para o controle da tuberculose (Xu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). O diagnóstico da TB baseia-se nos sintomas clínicos dos pacientes, achados radiológicos e na identificação do microrganismo pelo exame microscópico e/ou cultura. Entretanto, tais métodos apresentam algumas limitações, como a baixa sensibilidade do exame de escarro, a demora para obter o resultado da cultura e a baixa especificidade dos exames clínicos e radiológicos. O diagnóstico imunológico ou imunodiagnóstico, que visa avaliar a resposta imune celular e humoral do hospedeiro frente a antígenos do bacilo, é considerado uma opção atraente para identificar a presença de infecção pelo *M. tuberculosis* ou a doença (Zhang *et al.*, 2013). Recentemente, novos métodos baseados na quantificação “in vitro” da resposta imune celular têm utilizado ensaios de detecção de IFN- γ que quantificam a liberação desta citocina por linfócitos T em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis* (Chee, Barkham, et al., 2009; Latorre e Dominguez, 2015). Nesse contexto, tendo como ferramentas novos antígenos relacionados às fases de latência ou antígenos DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029, Rv1733), antígenos da fase de reativação da doença ou antígenos Rpf (Rv0867, Rv2389) e antígenos da fase de multiplicação ativa do *M. tuberculosis* (ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv3353). Os resultados mais importantes deste presente trabalho foram: (i) Pacientes com TB ativa apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG1 contra antígenos de diferentes fases da infecção pelo *M. tuberculosis*, havendo diminuição após 6 meses de tratamento; (ii) Análise da curva ROC mostrou alta sensibilidade e especificidade dos antígenos Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 no diagnóstico da TB; (iii) Contatos TB apresentaram níveis aumentados de anticorpos IgG e IgG1 contra os antígenos ESAT-6/CFP-10 e Rv1733, e alta produção de IFN- γ em resposta ao Rv1733; (iv) Alta produção de IFN- γ e TNF- α foi observada no sobrenadante de culturas de PBMC de pacientes com TB pulmonar ativa em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10 e em uma mesma análise foram observados níveis reduzidos de IL-4, IL-10 e IL17, confirmando uma polarização para uma resposta tipo Th1 na infecção pelo *M. tuberculosis*; (v) Níveis séricos elevados de CXCL-8, CXCL-9 e CXCL-10 foram detectados na fase ativa da infecção, sendo observado diminuição de CXCL-9 e CXCL-10 após 6 meses de tratamento.

Embora durante a infecção pelo *M. tuberculosis* a resposta imune celular seja mais importante na defesa contra a micobactéria e o papel da imunidade humoral permaneça incerto, anticorpos IgG específicos à micobactéria estão presentes em pacientes com TB, sugerindo que a caracterização de anticorpos específicos no soro humano pode ser de grande valor para o diagnóstico da TB (Wu *et al.*, 2010; Welch *et al.*, 2012).

O diagnóstico sorológico é um método atraente por ser um teste relativamente simples de ser implementado, de baixo custo, e por não requerer células vivas. Além disso, apresenta vantagens em certas situações onde o paciente é incapaz de produzir escarro adequado para o exame de baciloscopia ou quando este apresenta baciloscopia negativa, como em casos de crianças com TB e de pacientes com TB extrapulmonar (Abebe *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). No entanto, ainda que os ensaios sorológicos apresentem muitas características que poderiam otimizar o diagnóstico da TB, até o momento, nenhum teste apresentou níveis satisfatórios de sensibilidade e especificidade, que resultasse na padronização e validação destes testes para serem utilizados no diagnóstico da TB (Weldingh *et al.*, 2005). Por esse motivo a Organização Mundial de Saúde, em 2011, elaborou um documento orientando a não utilização de testes sorológicos no diagnóstico da TB (Who, 2011).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares avançadas, numerosos antígenos têm sido identificados e aplicados no sorodiagnóstico da TB (Xu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Neste estudo, utilizando o método de ELISA, avaliamos o potencial diagnóstico de antígenos do *M. tuberculosis* de fase ativa (Rv0717 e Rv3353), antígenos DosR (Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv1737) e antígenos Rpf (Rv0867, Rv2389), através de sua detecção por anticorpos IgG1 específicos presentes no soro de pacientes com TB e em indivíduos controles sadios. Como controle positivo foi utilizada a proteína de fusão ESAT-6/CFP-10, antígeno imunodominante, preservado em linhagens virulentas, tais como *M. bovis* e *M. tuberculosis* e ausentes em linhagens do *M. bovis* BCG e em micobactérias do ambiente (Mahairas *et al.*, 1996).

Neste trabalho, conforme esperado, pacientes com TB ativa apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG1 contra o ESAT-6/CFP-10, quando comparados ao grupo controle sadio vacinado com BCG. Além disso, a análise da curva ROC mostrou sensibilidade de 91% e especificidade de 82%, confirmando o bom desempenho da proteína de fusão ESAT-6/CFP-10 no diagnóstico da TB (Mattos *et al.*, 2010).

Entretanto, Xu *et al.* (2012) observaram sensibilidade de 65% e especificidade de 91% ao detectarem anticorpos IgG contra ESAT-6/CFP-10, enquanto Greenaway *et al.* (2005) obtiveram sensibilidade de 67% e 63% e especificidade de 51% e 53%, frente aos antígenos ESAT-6 e CFP-10, respectivamente. Tal variabilidade na sensibilidade e especificidade pode estar relacionada com o nível de exposição da população ao patógeno. Hoff *et al.* (2007) observaram que indivíduos de área endêmica para TB, como a Etiópia, apresentaram níveis mais elevados de anticorpos específicos para antígenos do *M. tuberculosis* que indivíduos de áreas não endêmicas, como a Dinamarca, e áreas de intermediária endemicidade, como o Brasil.

Os resultados deste presente trabalho mostram que seis dos nove antígenos testados, dois expressos na fase ativa (Rv0717 e Rv3353), três na fase de latência (Rv1733, Rv2628 e Rv2029) e o Rpf Rv0867, expresso na fase de reativação, apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG1 específicos no soro de pacientes com TB ativa, apresentando sensibilidade de 82 a 100% e especificidade de 82 a 95%. Interessantemente, diferentes estudos têm demonstrado bom desempenho na atuação dos antígenos Rv1733 (Leyten *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2009; Schuck *et al.*, 2009; Kassa *et al.*, 2012; Serra-Vidal *et al.*, 2014), Rv2029, Rv2628 (Leyten *et al.*, 2006; Chiacchio *et al.*, 2011), Rv0867 (Chegou, Black, *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013), em discriminar indivíduos com infecção latente, através da produção de IFN- γ . Os resultados do presente estudo sugerem que os antígenos Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 apresentam grande potencial como candidatos para o diagnóstico da TB. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a sensibilidade e especificidade destes antígenos na detecção de pacientes com TB em populações com alta incidência de infecção latente.

Em estudo recente realizado pelo nosso laboratório, níveis de anticorpos IgG anti-16kDa aumentaram significativamente nos pacientes TB após 3 meses de quimioterapia em relação aos pacientes TB não tratados. Sugerimos que tal fenômeno é consistente com as características do antígeno 16kDa, um antígeno citosólico. O início da quimioterapia, neste caso, pode ocasionar a morte das bactérias com liberação de grande quantidade de proteína, e conseqüentemente, intensa estimulação da resposta humoral e aumento dos níveis de anticorpos anti-16kDa (Mattos *et al.*, 2010). No presente estudo, o mesmo foi observado para o antígeno de fase ativa Rv0717, uma proteína ribossomal 30S (Cole e Cook, 1998), e para o antígeno de latência Rv1733, possível proteína de membrana (Leyten *et al.*, 2006).

Assim como o 16kDa, tanto Rv0717 como Rv1733 referem-se a proteínas que não são secretadas durante a infecção, sendo possível que ocorra uma grande exposição destes antígenos após início do tratamento, levando, conseqüentemente, a uma intensa resposta humoral. Alternativamente, a quimioterapia pode favorecer o desaparecimento da circulação de antígenos micobacterianos, o que poderia resultar na diminuição da formação de complexos imunes, favorecendo a detecção de anticorpos específicos (Imaz e Zerbini, 2000).

A análise da curva ROC, tendo como parâmetro o grupo de pacientes com 1-3 meses de tratamento, mostrou que quatro dos nove antígenos testados, um expresso na fase ativa (Rv0717), dois antígenos de latência (Rv1733, Rv2628) e o Rpf Rv0867 apresentaram melhor desempenho que o ESAT-6/CFP-10, com uma sensibilidade de 95 a 100% e especificidade de 90 a 95%, sugerindo que os antígenos Rv0717, Rv1733, Rv2628 e Rv0867 podem atuar como bons marcadores para monitorar o tratamento da TB.

O presente trabalho também mostrou que, após completado o tratamento, os títulos de anticorpos diminuem significativamente, retornando a níveis similares àqueles observados em indivíduos controles não infectados. Em concordância, Sireci *et al.* (2007) observaram níveis reduzidos de anticorpos IgG específicos ao antígeno 16kDa em crianças com TB após a quimioterapia. Nossos resultados estão também em conformidade com estudos que sugerem a importância dos anticorpos IgG1 no monitoramento do tratamento contra a TB, funcionando como biomarcadores da doença (Drowart *et al.*, 1991; Biraro *et al.*, 2015). Além disso, estudos mostram uma predominância de anticorpos IgG1 em relação às subclasses IgG2 e IgG4 no soro de pacientes com TB ativa, sugerindo que IgG1 seja um importante marcador no diagnóstico da TB (Hussain *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2005; Mattos *et al.*, 2010).

Trabalhos recentes têm dado grande importância à pesquisa de biomarcadores que consigam distinguir pacientes com TB ativa de indivíduos que são portadores de infecção latente (Walzl, Ronacher *et al.* 2011, Clifford, Zufferey *et al.* 2015, Wu, Wang *et al.* 2016). O teste tuberculínico ou teste Mantoux foi descrito em 1912 por Charles Mantoux e é até hoje utilizado no diagnóstico da TB latente, apesar de sua especificidade ser comprometida devido a reações cruzadas com a cepa vacinal do *M. bovis* (BCG) e com as micobactérias não-tuberculosas (Nayak e Acharjya, 2012). Além disso, o teste apresenta baixa sensibilidade em pacientes imunocomprometidos (Latorre e Dominguez, 2015). O ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA) foi implementado

recentemente como um método alternativo para o diagnóstico da LTBI (Lalvani e Pareek, 2010). Entretanto, apesar de ser um teste mais específico que a prova tuberculínica, o IGRA não consegue diferenciar pacientes com TB ativa de indivíduos com infecção latente e, portanto, não se mostra como um teste ideal para o diagnóstico da TB em países onde grande proporção da população está propensa a abrigar a forma latente da infecção (Chee, Barkham, *et al.*, 2009; Lalvani e Pareek, 2010). O presente estudo avaliou o perfil de anticorpos séricos IgG e IgG1 contra os antígenos de fase de latência (Rv1733, Rv2628 e Rv2029) e antígenos de fase ativa (ESAT-6/CFP-10 e Rv0717) do *M. tuberculosis* em indivíduos contatos TB com diagnóstico de infecção latente, em comparação com pacientes com TB ativa e controles saudáveis. Nossos resultados mostram que níveis aumentados de anticorpos IgG específicos para o antígeno ESAT-6/CFP-10 foram detectados no soro de pacientes com TB ativa quando comparado aos controles sadio e contatos TB. Além disso, o grupo de contatos TB apresentou níveis de anticorpos IgG contra o antígeno ESAT-6/CFP-10 e contra o antígeno DosR Rv1733 significativamente mais altos quando comparado com grupo controle sadio. Diferente dos nossos resultados, outros autores mostraram que apesar dos pacientes com TB apresentarem níveis aumentados de anticorpos IgG anti-ESAT-6/CFP-10, os grupos de indivíduos contatos e controles sadio não diferiam quanto aos níveis de anticorpos IgG no soro (Legesse *et al.*, 2013; Hur, Kim, *et al.*, 2015). Entretanto, Hoff *et al.* (2007) mostraram resultados semelhantes aos nossos achados quando analisaram o perfil de anticorpos IgG no soro de pacientes com TB ativa, indivíduos contato TB e controles saudáveis de uma população residente no Estado de São Paulo, Brasil. Além disso, foi demonstrado que o perfil de anticorpos pode variar de acordo com o grau de exposição da população à infecção. Países com alta endemicidade para TB apresentaram níveis de anticorpos significativamente mais elevados na população que países com intermediária e baixa endemicidade (Hoff *et al.*, 2007). Isto indica que a incidência da TB em um determinado país tem uma forte influência sobre as respostas de anticorpos a antígenos do *M. tuberculosis*, provavelmente, refletindo a exposição repetida ao patógeno (Hoff *et al.*, 2007). Corroborando com essa hipótese, Fabri (2015) observaram níveis significativos de anticorpos anti-*Mycobacterium leprae* no soro de indivíduos contatos e na população em geral, em uma região endêmica para a Hanseníase no Estado de Minas Gerais.

Estudos em humanos e modelos animais demonstraram que os títulos de anticorpos anti-*M. tuberculosis* estão correlacionados com a carga bacteriana do paciente (Achkar e Ziegenbalg, 2012; Achkar e Casadevall, 2013). Interessantemente, respostas aumentadas de anticorpos foram associadas à carga bacteriana na infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Fabri (2015) observaram que pacientes com a forma clínica virchowiana, caracterizada pela intensa bacteremia, apresentaram níveis mais elevados de anticorpos do que pacientes com a forma clínica tuberculóide, caracterizada por uma carga bacilar menos intensa. Além disso, a produção de anticorpos pode diferir durante a infecção latente e a doença ativa na TB, apresentando assim, um amplo espectro de respostas humorais dependente do estágio de infecção do hospedeiro (Davidow *et al.*, 2005; Senoputra *et al.*, 2015).

Com relação à dosagem de IgG1 anti-ESAT-6/CFP-10, observamos que pacientes com TB ativa não apresentaram diferença no perfil de anticorpos quando comparados com o grupo apresentando infecção latente. O mesmo resultado foi observado para os antígenos Rv1733 e Rv2029 na detecção de IgG1 e para os antígenos Rv0717, Rv1733 e Rv2029 na detecção de IgG total. Embora tais resultados sugerem que IgG anti-ESAT-6/CFP-10 seja um bom marcador da infecção latente, o fato de pacientes com TB ativa apresentarem níveis significativos de anticorpos anti-ESAT-6/CFP-10 pode gerar conflitos no diagnóstico da TB latente versus doença ativa. Desta forma, estes resultados indicam que a detecção de IgG para os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv0717, Rv1733 e Rv2029, e de IgG1 contra os antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e Rv2029 pode auxiliar no diagnóstico da TB ativa, funcionando como um biomarcador, mas assim como o IGRA, não foi capaz de discriminar a TB ativa da infecção latente (Janssens *et al.*, 2007; Chee, Lim, *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos tem utilizado antígenos expressos nas diferentes fases do ciclo de vida do *M. tuberculosis* para explorar a resposta de linfócitos T produtores de IFN- γ na pesquisa por biomarcadores que apresentem melhor capacidade em discriminar pacientes com TB ativa de indivíduos com a infecção latente (Latorre e Dominguez, 2015; Goletti *et al.*, 2016). Além disso, estudos tem identificado outros marcadores como citocinas e quimiocinas que, em tese, poderiam auxiliar no diagnóstico e ajudar a monitorar a resposta ao tratamento na TB (Clifford *et al.*, 2015; Goletti *et al.*, 2016). Com essa expectativa e com base em estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo (Abramo *et al.*, 2006; Almeida Cde *et al.*, 2009; Mattos

et al., 2010), o antígeno ESAT-6/CFP-10 (fase de doença ativa) e os antígenos Rv1733 e Rv2029 (fase de latência) foram selecionados para a avaliação do perfil de resposta celular de pacientes TB e indivíduos contatos TB com diagnóstico de infecção latente. Os resultados obtidos mostraram elevada produção de IFN- γ e TNF- α quando PBMC de pacientes com TB pulmonar ativa foram estimuladas com ESAT-6/CFP10. Em concordância com os nossos resultados, Kassa *et al.* (2012) demonstraram que pacientes com TB ativa apresentam níveis elevados de IFN- γ e TNF- α em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10. Além disso, estes achados confirmam os resultados observados no estudo desenvolvido pelo nosso grupo, que aponta um perfil de resposta Th1 em pacientes com TB pulmonar ativa (Mattos *et al.*, 2010). Além disso, também observamos no presente estudo, que pacientes com TB ativa e indivíduos com infecção latente apresentaram produção significativa de IFN- γ quando comparados aos controles sadios. No entanto, pacientes com TB ativa e indivíduos com infecção latente não diferiram quanto a produção de IFN- γ . Em conformidade com os nossos resultados, Schuck *et al.* (2009) não observaram diferença entre os níveis de IFN- γ produzidos pelos grupos de pacientes com TB ativa e LTBI em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10. O mesmo foi observado por Hur, Kang, *et al.* (2015) em resposta aos antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7. Esses resultados sugerem que o antígeno ESAT-6/CFP-10 tem um potencial limitado para o diagnóstico da TB, uma vez que, assim como o IGRA, não consegue discriminar a TB ativa da infecção latente (Latorre e Dominguez, 2015). Desta forma, podemos concluir que a dosagem de IFN- γ e TNF- α no sobrenadante de cultura de pacientes com TB ativa em resposta ao ESAT-6/CFP-10 pode auxiliar no diagnóstico da TB, mas falha em discriminar a infecção latente da infecção ativa.

Para os antígenos de latência Rv1733 e Rv2029, não houve diferença significativa na produção de IFN- γ e TNF- α entre o grupo de pacientes com TB ativa e o grupo controle sadio. Entretanto, foi observado um pico na produção dessas citocinas no grupo de pacientes com 3 meses de tratamento. Contrário aos nossos resultados, Kassa *et al.* (2012) detectaram níveis significativos de IFN- γ no sangue total de pacientes com TB ativa após estímulo com o antígeno Rv1733. Interessantemente, no presente trabalho, níveis de IFN- γ detectados no sobrenadante de cultura de células PBMC estimuladas com o antígeno de latência Rv1733 em indivíduos contatos TB foram significativamente maiores quando comparados aos

níveis mensurados no sobrenadante de cultura dos pacientes com TB ativa e controles saudáveis. Em concordância com esses resultados, Schuck *et al.* (2009) também observaram níveis significativos de IFN- γ no sobrenadante de cultura de indivíduos contatos TB com diagnóstico de infecção latente, quando comparados com pacientes com TB ativa e controles saudáveis. Em conformidade, Serra-Vidal *et al.* (2014) também observaram níveis elevados de IFN- γ no sobrenadante de cultura de contatos TB quando comparados com controles sadio e pacientes com TB ativa. No entanto, em contraste com o nosso estudo, a produção de IFN- γ foi avaliada do sobrenadante que ficou em cultura por apenas 18 horas. Isto difere do nosso trabalho, que dosou IFN- γ após 96 horas de cultura, e reforça a importância de uma padronização do tempo de cultura para aplicações futuras no diagnóstico da TB latente. Outro estudo, realizado em três países com grande prevalência de TB latente, África do Sul, Gâmbia e Uganda, mostrou que o antígeno de latência Rv1733 é fortemente reconhecido nessas populações (Black *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que a dosagem de IFN- γ no sobrenadante de cultura após estímulo com o antígeno de latência Rv1733 pode ser considerado promissor para auxiliar no diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis*.

Assim como os antígenos Rv0717 e Rv1733 induziram um pico de resposta por anticorpos IgG1 após 1-3 meses de tratamento, similarmente, níveis de TNF- α e IFN- γ em resposta aos antígenos ESAT-6/CFP-10, Rv1733 e RV2029 aumentaram significativamente após 3 meses de tratamento e reduziram aos níveis do controle sadio após 6 meses de quimioprevenção. De acordo com nossos achados, estudos desenvolvidos por outros autores tem mostrado redução dos níveis de IFN- γ e TNF- α no soro/plasma e no sobrenadante de cultura de pacientes após 6 meses de tratamento (Ameglio *et al.*, 2005; Peresi *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2010). Interessantemente, Ribeiro-Rodrigues *et al.* (2002) mostraram que escarro de pacientes com TB após o tratamento apresentaram níveis reduzidos de IFN- γ e TNF- α , o que foi correlacionado com redução da carga bacilar. Além disso, Nicol *et al.* (2005) observaram aumento no número de células produtoras de IFN- γ em resposta aos antígenos PPD e ESAT-6 após um mês de tratamento em crianças com TB, e esses níveis diminuíram após três e seis meses. Uma possível compreensão para esse fenômeno se deve ao fato de que a secreção de proteínas específicas do *M. tuberculosis*, como ESAT-6/CFP-10, requer bacilos viáveis e metabolicamente ativos,

logo as células produtoras de IFN- γ e TNF- α poderiam estar presentes em alta frequência durante a fase de ativa replicação bacteriana. Com o início do tratamento, há um aumento da exposição dessas proteínas, pela morte das bactérias, o que justificaria o pico na detecção dessas citocinas após 3 meses de tratamento. Após completada a quimioterapia, e havendo diminuição da exposição a esses antígenos, haveria uma redução no número de células produtoras de IFN- γ e TNF- α e diminuição da produção dessas citocinas.

Diferente dos resultados encontrados para IFN- γ e TNF- α , não observamos nenhuma alteração nos níveis de IL-17, IL-10 e IL-4 no sobrenadante de cultura dos grupos testados. Em conformidade com os nossos resultados, Hur, Kang, *et al.* (2015) não observaram diferença nos níveis de IL-17, IL-10 e IL-4 no sobrenadante de cultura em resposta aos antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 quando pacientes com TB ativa foram comparados com controles saudáveis. Interessantemente, níveis elevados de IL-10 e IL-4 têm sido detectados em pacientes com TB severa (Rook *et al.*, 2004). Esses pacientes mostram um perfil clínico diferente dos pacientes avaliados no presente estudo, no qual predominam formas menos graves da TB. Explicando o papel regulatório dessas citocinas, foi descrito na literatura que baixos níveis de IL-10 e IL-4 podem favorecer o desenvolvimento de uma resposta tipo Th1, uma vez que a IL-10 pode, indiretamente, inibir a resposta Th1 por reprimir a secreção de IL-12 por macrófagos ativados (Higgins *et al.*, 2009). A IL-4 pode atuar reprimindo a expressão do receptor de IL-12, desviando a resposta para um perfil Th2 (Szabo *et al.*, 1997). Assim, nossos resultados sugerem a polarização de uma resposta com o perfil tipo Th1 na tuberculose pulmonar, corroborando achados anteriores (Mattos *et al.*, 2010).

Diferente dos resultados obtidos para IFN- γ , não foi detectado aumento significativo da quimiocina CXCL-10 por PBMC em resposta ao estímulo com ESAT-6/CFP-10. No entanto, foi observada uma tendência em detectar maior produção de CXCL-10 nos grupos TB ativa e LTBI comparado ao grupo controle sadio. Apesar de não apresentar diferença significativa, esta tendência parece estar em conformidade com os resultados apresentados por outros autores que observaram maior produção de CXCL-10 pelos grupos TB ativa e LTBI quando comparado com o grupo controle sadio, em resposta aos antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 (Hong *et al.*, 2012; Tebruegge *et al.*, 2015). Interessantemente, contrário a dosagem no sobrenadante, o nível de CXCL-10 encontrado no soro de pacientes com TB ativa foi significativamente

mais alto quando comparado com o nível encontrado no soro dos indivíduos com LTBI e controle sadio. Além disso, os níveis de CXCL-10 no soro de pacientes com TB diminuíram significativamente após 6 meses de tratamento. Almeida Cde *et al.* (2009) já haviam observado que os níveis de CXCL-10 aumentados antes do tratamento, eram semelhantes ao observado no grupo controle após completado o tratamento anti TB. Hong *et al.* (2012) observaram resultados semelhantes quando dosaram CXCL-10 no soro e no sobrenadante de cultura de pacientes com TB ativa em comparação com indivíduos com LTBI e controles sadio e, em um outro estudo, observaram que os níveis de CXCL-10 diminuíram significativamente com o tratamento (Hong *et al.*, 2014). Embora Azzurri *et al.* (2005) tenham obtido resultados semelhantes ao observarem níveis elevados de CXCL-10 no plasma de pacientes com TB ativa, níveis significativos de CXCL-10 foram detectados no soro de controles que tiveram contato doméstico com pacientes TB, em comparação com controles sadios, formado por indivíduos representantes da comunidade. Assim, embora estudos apontem o CXCL-10 como um marcador promissor no diagnóstico da infecção pelo *M. tuberculosis*, ainda há muita controvérsia quanto a sua capacidade em discriminar os pacientes com TB ativa dos indivíduos com infecção latente (Ruhwald *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012; Biraro *et al.*, 2015; Tebruegge *et al.*, 2015).

Resultados semelhantes aos descritos acima foram observados, no presente estudo, para as quimiocinas CXCL-8 e CXCL-9. Pacientes com TB ativa apresentaram níveis aumentados dessas quimiocinas no soro quando comparados com indivíduos contatos TB com diagnóstico de TB latente e com controles sadios. Além disso, para a quimiocina CXCL-9, mas não para CXCL-8, a quantidade da quimiocina diminuiu significativamente após 6 meses de tratamento. Estudos têm mostrado a presença de níveis significativos de CXCL-9 no sobrenadante de cultura de pacientes com TB pulmonar ativa em resposta ao antígeno ESAT-6/CFP-10 (Abramo *et al.*, 2006) e CXCL-8 e CXCL-9 no plasma de pacientes com TB ativa (Alessandri *et al.*, 2006; Almeida Cde *et al.*, 2009). Em concordância com os nossos resultados, Juffermans *et al.* (1999) não observaram níveis reduzidos de CXCL-8 no soro após o tratamento anti-TB. No entanto, diferindo dos nossos dados, estudos tem observado redução dos níveis de CXCL-8 no plasma após o tratamento (Alessandri *et al.*, 2006; Almeida Cde *et al.*, 2009). Uma possível explicação para os níveis elevados de CXCL-8 no soro após o tratamento pode estar na manipulação do sangue para sua obtenção, uma vez que a preparação do soro está associada à ativação plaquetária, e já foi observado

que as plaquetas quando ativadas podem conduzir à liberação de algumas quimiocinas, dentre elas o CXCL-8 (Gear e Camerini, 2003). Com relação a CXCL-9, assim como CXCL-10, estudos têm mostrado que, após o tratamento, pacientes TB apresentam reduzidas taxas dessas quimiocinas no plasma (Alessandri *et al.*, 2006; Almeida Cde *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2014).

As quimiocinas estão envolvidas na quimiotaxia e ativação de leucócitos com o propósito de auxiliar na formação do granuloma e controlar a infecção causada pelo *M. tuberculosis* (Algood *et al.*, 2003). Ambos, CXCL-9 e CXCL-10, são capazes de atrair linfócitos T ativados, incluindo células expressando CXCR-3, sendo razoável sugerir que a concentração aumentada dessas quimiocinas pode desempenhar um papel importante na indução do recrutamento de linfócitos T na formação do granuloma, auxiliando no controle da TB. Por outro lado, após a quimioterapia o declínio nos níveis das quimiocinas parece espelhar um sucesso no controle do crescimento da micobactéria e consequente diminuição da inflamação granulomatosa (Alessandri *et al.*, 2006). Em síntese, esses resultados sugerem que as quimiocinas CXCL-8, CXCL-9 e CXCL-10 podem contribuir para auxiliar no diagnóstico da TB. Além disso, as quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10 podem ser utilizadas como parâmetro para monitorar a eficiência do tratamento anti-TB.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram uma avaliação inicial de possíveis biomarcadores que podem, no futuro, auxiliar no diagnóstico da tuberculose e no monitoramento do tratamento anti-TB. Entretanto, para isso, estudos adicionais utilizando um número maior de pacientes, e de diferentes regiões endêmicas e não endêmicas para tuberculose, são necessários para validar os resultados apresentados e identificar pontos de corte adequados.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Os resultados deste estudo sugerem que a detecção de anticorpos IgG1 contra os antígenos Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 pode representar uma ferramenta adicional no diagnóstico da TB.

- ✓ A elevada produção de citocinas específicas a antígenos do *M. tuberculosis*, a detecção de níveis aumentados de anticorpos IgG1 antígeno-específicos e a alta produção de quimiocinas mensuradas no soro podem servir como biomarcadores no diagnóstico e no monitoramento da TB.

- ✓ Esse trabalho sugere também um papel promissor do antígeno DosR Rv1733 para auxiliar no diagnóstico da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, pois foi capaz de estimular uma produção elevada de IFN-g nesses indivíduos.

7 REFERÊNCIAS

ABEBE, F. et al. Progress in serodiagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. **Scand J Immunol**, v. 66, n. 2-3, p. 176-91, Aug-Sep 2007. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635795> >.

ABEL, B. et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3155-62, Sep 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218133> >.

ABRAMO, C. et al. 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**, v. 8, n. 1, p. 45-51, Jan 2006. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269263> >.

ACHKAR, J. M.; CASADEVALL, A. Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 3, p. 250-62, Mar 13 2013. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498951> >.

ACHKAR, J. M. et al. Host Protein Biomarkers Identify Active Tuberculosis in HIV Uninfected and Co-infected Individuals. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1160-8, Sep 2015. ISSN 2352-3964 (Electronic)

2352-3964 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501113> >.

ACHKAR, J. M.; ZIEGENBALG, A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 12, p. 1898-906, Dec 2012. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100476> >.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-7, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963608> >.

ALATAS, F. et al. Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis. **Chest**, v. 125, n. 6, p. 2156-9, Jun 2004. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189936> >.

ALESSANDRI, A. L. et al. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. **Inflamm Res**, v. 55, n. 12, p. 528-33, Dec 2006. ISSN 1023-3830 (Print)

1023-3830 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17039284> >.

ALGOOD, H. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 6, p. 467-77, Dec 2003. ISSN 1359-6101 (Print)

1359-6101 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563349> >.

ALMEIDA CDE, S. et al. Anti-mycobacterial treatment reduces high plasma levels of CXC-chemokines detected in active tuberculosis by cytometric bead array. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1039-41, Nov 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027475> >.

ALVAREZ, N. et al. Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against Mycobacterium tuberculosis in a murine model of progressive pulmonary infection. **BMC Immunol**, v. 14 Suppl 1, p. S3, 2013. ISSN 1471-2172 (Electronic)

1471-2172 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458564> >.

AMEGLIO, F. et al. Post-treatment changes of six cytokines in active pulmonary tuberculosis: differences between patients with stable or increased fibrosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n. 1, p. 98-104, Jan 2005. ISSN 1027-3719 (Print)

1027-3719 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15675558> >.

ANDREU, J. et al. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. **Eur J Radiol**, v. 51, n. 2, p. 139-49, Aug 2004. ISSN 0720-048X (Print)

0720-048X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246519> >.

AREND, S. M. et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1850-4, May 2000. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823800> >.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **J Exp Med**, v. 142, n. 1, p. 1-16, Jul 1 1975. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/807671> >.

AZZURRI, A. et al. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. **Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 1-8, Jan 2005. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716076> >.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1715-24, Dec 19 2005. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365150> >.

BERTHET, F. X. et al. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). **Microbiology**, v. 144 (Pt 11), p. 3195-203, Nov 1998. ISSN 1350-0872 (Print)

1350-0872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846755> >.

BIRARO, I. A. et al. Effect of isoniazid preventive therapy on immune responses to mycobacterium tuberculosis: an open label randomised, controlled, exploratory study. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 438, 2015. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493989> >.

BLACK, G. F. et al. Immunogenicity of novel DosR regulon-encoded candidate antigens of Mycobacterium tuberculosis in three high-burden populations in Africa. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 8, p. 1203-12, Aug 2009. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553548> >.

BOCCHINO, M. et al. Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 10, p. 907-13, Oct 2008. ISSN 1435-4373 (Electronic)

0934-9723 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18470544> >.

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

BOOM, W. H. et al. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 98-106, 2003. ISSN 1472-9792 (Print)

1472-9792 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12758197> >.

BOSIO, C. M.; GARDNER, D.; ELKINS, K. L. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of Mycobacterium tuberculosis: delay in dissemination and development of lung pathology. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6417-25, Jun 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843697> >.

BURRILL, J. et al. Tuberculosis: a radiologic review. **Radiographics**, v. 27, n. 5, p. 1255-73, Sep-Oct 2007. ISSN 1527-1323 (Electronic)

0271-5333 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848689> >.

CARDOSO, F. L. et al. T-cell responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6707-14, Dec 2002. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438345> >.

CASCANTE, J. et al. [Diagnosis of tuberculosis infection]. **An Sist Sanit Navar**, v. 30 Suppl 2, p. 49-65, 2007. ISSN 1137-6627 (Print)

1137-6627 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898828> >.

CHAN, J. et al. The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. **Semin Immunol**, v. 26, n. 6, p. 588-600, Dec 2014. ISSN 1096-3618 (Electronic)

1044-5323 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25458990> >.

CHAVES, A. S. et al. Challenging Mycobacterium tuberculosis dormancy mechanisms and their immunodiagnostic potential. **Braz J Infect Dis**, v. 19, n. 6, p. 636-42, Nov-Dec 2015. ISSN 1678-4391 (Electronic)

1413-8670 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358744> >.

CHEE, C. B. et al. Quantitative T-cell interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens in active and latent tuberculosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 28, n. 6, p. 667-70, Jun 2009. ISSN 1435-4373 (Electronic)

0934-9723 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19020909> >.

CHEE, C. B. et al. Use of a T cell interferon-gamma release assay to evaluate tuberculosis risk in newly qualified physicians in Singapore healthcare institutions. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 30, n. 9, p. 870-5, Sep 2009. ISSN 1559-6834 (Electronic)

0899-823X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637958> >.

CHEGOU, N. N. et al. Potential of novel Mycobacterium tuberculosis infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. **BMC Infect Dis**, v. 12, p. 10, 2012. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260319> >.

CHEGOU, N. N. et al. Potential of host markers produced by infection phase-dependent antigen-stimulated cells for the diagnosis of tuberculosis in a highly endemic area. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38501, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693640> >.

CHEN, X. et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. **Clin Immunol**, v. 123, n. 1, p. 50-9, Apr 2007. ISSN 1521-6616 (Print)

1521-6616 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234458> >.

CHIACCHIO, T. et al. Higher frequency of T-cell response to *M. tuberculosis* latency antigen Rv2628 at the site of active tuberculosis disease than in peripheral blood. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27539, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102905> >.

CHOW, J. C. et al. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **J Biol Chem**, v. 274, n. 16, p. 10689-92, Apr 16 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196138> >.

CLIFFORD, V. et al. Cytokines for monitoring anti-tuberculous therapy: A systematic review. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 95, n. 3, p. 217-28, May 2015. ISSN 1873-281X (Electronic)

1472-9792 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25797612> >.

COELHO, A. G. V. et al. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 707-711, 2007.

COLE, E. C.; COOK, C. E. Characterization of infectious aerosols in health care facilities: an aid to effective engineering controls and preventive strategies. **Am J Infect Control**, v. 26, n. 4, p. 453-64, Aug 1998. ISSN 0196-6553 (Print)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721404> >.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-44, Jun 11 1998. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634230> >.

COMMANDEUR, S. et al. Identification of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factors in long-term latently infected individuals. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 4, p. 676-83, Apr 2011. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248154> >.

CONDE, M. B. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 393-422, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302046> >.

COOPER, A. M. et al. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 5, p. 221-6, May 2002. ISSN 0966-842X (Print)

0966-842X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11973155> >.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 641-76, 2003. ISSN 0066-4227 (Print)

0066-4227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527294> >.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K.; PICON, P. D. [Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control]. **Rev Saude Publica**, v. 41 Suppl 1, p. 34-42, Sep 2007. ISSN 0034-8910 (Print)

0034-8910 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18038089> >.

DAO, D. N. et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2067-74, Apr 2004. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039328> >.

DAVIDOW, A. et al. Antibody profiles characteristic of Mycobacterium tuberculosis infection state. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6846-51, Oct 2005. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177363> >.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 37-49, Jan 9 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135887> >.

DE CHASTELLIER, C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 526-42, 2009. ISSN 1878-3279 (Electronic)

0171-2985 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261352> >.

DE SOUZA, M. A. et al. [Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in American tegumentary leishmaniasis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 2, p. 137-41, Mar-Apr 2005. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821787> >.

DE VALLIERE, S. et al. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6711-20, Oct 2005. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177348> >.

DEMISSIE, A. et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 2, p. 179-86, Feb 2006. ISSN 1556-6811 (Print)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16467323> >.

DIVANGAHI, M. et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 7157-65, Nov 15 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981137> >.

DLUGOVITZKY, D. et al. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). **Clin Exp Immunol**, v. 122, n. 3, p. 343-9, Dec 2000. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122239> >.

DROWART, A. et al. Antibody levels to whole culture filtrate antigens and to purified P32 during treatment of smear-positive tuberculosis. **Chest**, v. 100, n. 3, p. 685-7, Sep 1991. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1889257> >.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 8, p. 581-91, Aug 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790178> >.

FABRI, A. C. O. C., CARVALHO, A. P. M., ARAUJO, S., GOULART, L. R., MATTOS, A. M. M., TEIXEIRA, H. C., GOULART, I. M. B., DUTHIE, M. S., OLIVEIRA, R. O. AND LANA, F. C. F. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, 2015.

FERGUSON, J. S. et al. Complement protein C3 binding to Mycobacterium tuberculosis is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. **Infect Immun**, v. 72, n. 5, p. 2564-73, May 2004. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102764> >.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 93-129, 2001. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244032> >.

FOX, G. J. et al. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, v. 41, n. 1, p. 140-56, Jan 2013. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936710> >.

GANGULY, N.; SIDDIQUI, I.; SHARMA, P. Role of M. tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 88, n. 6, p. 510-7, Nov 2008. ISSN 1873-281X (Electronic)

1472-9792 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640874> >.

GARDAM, M. A. et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 148-55, Mar 2003. ISSN 1473-3099 (Print)

1473-3099 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12614731> >.

GEAR, A. R.; CAMERINI, D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. **Microcirculation**, v. 10, n. 3-4, p. 335-50, Jun 2003. ISSN 1073-9688 (Print)

1073-9688 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851650> >.

GEIJTENBEEK, T. B. et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 575-85, Mar 3 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721994> >.

GETAHUN, H. et al. Latent Mycobacterium tuberculosis infection. **N Engl J Med**, v. 372, n. 22, p. 2127-35, May 28 2015. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26017823> >.

GILLERON, M. et al. Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 37, p. 34896-904, Sep 14 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441009> >.

GLATMAN-FREEDMAN, A. et al. Clearance and organ distribution of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding immunoglobulin M. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, p. 335-41, Jan 2000. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603406> >.

GOLETTI, D. et al. Response to Rv2628 latency antigen associates with cured tuberculosis and remote infection. **Eur Respir J**, v. 36, n. 1, p. 135-42, Jul 2010. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926735> >.

GOLETTI, D. et al. Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 6, p. 544-50, Jun 2006. ISSN 1198-743X (Print)

1198-743X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700703> >.

GOLETTI, D. et al. Tuberculosis Biomarkers: From Diagnosis to Protection. **Infect Dis Rep**, v. 8, n. 2, p. 6568, Jun 24 2016. ISSN 2036-7430 (Print)

2036-7430 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403267> >.

GONZALEZ-JUARRERO, M. et al. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 3128-35, Sep 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960339> >.

GREEN, A. M. et al. CD4(+) regulatory T cells in a cynomolgus macaque model of Mycobacterium tuberculosis infection. **J Infect Dis**, v. 202, n. 4, p. 533-41, Aug 15 2010. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617900> >.

GREENAWAY, C. et al. Humoral response to Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n. 10, p. 1112-9, Oct 2005. ISSN 1027-3719 (Print)

1027-3719 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229222> >.

GUERMONPREZ, P. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 397-402, Sep 25 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508489> >.

GUO, S. et al. The CFP10/ESAT6 complex of Mycobacterium tuberculosis may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. **Med Hypotheses**, v. 78, n. 3, p. 389-92, Mar 2012. ISSN 1532-2777 (Electronic)

0306-9877 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192908> >.

GUPTA, R. K.; SRIVASTAVA, B. S.; SRIVASTAVA, R. Comparative expression analysis of rpf-like genes of Mycobacterium tuberculosis H37Rv under different physiological stress and growth conditions. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 9, p. 2714-22, Sep 2010. ISSN 1465-2080 (Electronic)

1350-0872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522500> >.

GUPTA, S. et al. IgG subclass antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis. **Med Sci Monit**, v. 11, n. 12, p. CR585-8, Dec 2005. ISSN 1234-1010 (Print)

1234-1010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319790> >.

HARBOE, M. et al. B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v. 66, n. 2, p. 717-23, Feb 1998. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453632> >.

HARBOE, M. et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 16-22, Jan 1996. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557334> >.

HART, C. A.; BEECHING, N. J.; DUERDEN, B. I. Tuberculosis into the next century. **The Journal Medical Microbiology**, v. 44, p. 1- 34, 1996.

HELB, D. et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 229-37, Jan 2010. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864480> >.

HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740-5, Dec 7 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130078> >.

HIGGINS, D. M. et al. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 2, p. 149-57, Mar 2009. ISSN 1873-281X (Electronic)

1472-9792 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19213603> >.

HOFF, S. T. et al. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis--specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil, and Denmark. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 5, p. 575-82, Sep 1 2007. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17682991> >.

HONG, J. Y. et al. Efficacy of inducible protein 10 as a biomarker for the diagnosis of tuberculosis. **Int J Infect Dis**, v. 16, n. 12, p. e855-9, Dec 2012. ISSN 1878-3511 (Electronic)

1201-9712 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22959355> >.

HONG, J. Y. et al. Efficacy of IP-10 as a biomarker for monitoring tuberculosis treatment. **J Infect**, v. 68, n. 3, p. 252-8, Mar 2014. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247066> >.

HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M. N. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword? **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 179174, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24350246> >.

HUANG, W. et al. Interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis Rpf proteins in contact investigation. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 93, n. 6, p. 612-7, Nov 2013. ISSN 1873-281X (Electronic)

1472-9792 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053975> >.

HUR, Y. G. et al. Adjunctive biomarkers for improving diagnosis of tuberculosis and monitoring therapeutic effects. **J Infect**, v. 70, n. 4, p. 346-55, Apr 2015. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452040> >.

HUR, Y. G. et al. Evaluation of antigen-specific immunoglobulin g responses in pulmonary tuberculosis patients and contacts. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 904-9, Mar 2015. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25588651> >.

HUSSAIN, R.; KIFAYET, A.; CHIANG, T. J. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. **Infect Immun**, v. 63, n. 2, p. 410-5, Feb 1995. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822004> >.

IMAZ, M. S.; ZERBINI, E. Antibody response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* during and after treatment of tuberculosis patients. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, n. 6, p. 562-9, Jun 2000. ISSN 1027-3719 (Print)

1027-3719 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864188> >.

ISEMAN, M. D. Treatment and implications of multidrug-resistant tuberculosis for the 21st century. **Chemotherapy**, v. 45 Suppl 2, p. 34-40, 1999. ISSN 0009-3157 (Print)

0009-3157 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449896> >.

JANSSENS, J. P. et al. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 30, n. 4, p. 722-8, Oct 2007. ISSN 0903-1936 (Print)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537773> >.

JASENOSKY, L. D. et al. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **Immunol Rev**, v. 264, n. 1, p. 74-87, Mar 2015. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703553> >.

JOHNSON, C. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. **Tuber Lung Dis**, v. 78, n. 5-6, p. 257-61, 1997. ISSN 0962-8479 (Print)

0962-8479 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209680> >.

JONES, B. W. et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 1036-44, Jun 2001. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404392> >.

JUFFERMANS, N. P. et al. 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**, v. 67, n. 8, p. 4295-7, Aug 1999. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417209> >.

KANUNFRE, K. A. et al. Enhancement of diagnostic efficiency by a gamma interferon release assay for pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 6, p. 1028-30, Jun 2008. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400971> >.

KASSA, D. et al. Analysis of immune responses against a wide range of Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 12, p. 1907-15, Dec 2012. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015647> >.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 129-63, 1993. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8476559> >.

_____. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905811> >.

_____. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. **Ann Rheum Dis**, v. 61 Suppl 2, p. ii54-8, Nov 2002. ISSN 0003-4967 (Print)

0003-4967 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379623> >.

_____. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends Immunol**, v. 26, n. 12, p. 660-7, Dec 2005. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246622> >.

KEANE, J. et al. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect Immun**, v. 65, n. 1, p. 298-304, Jan 1997. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8975927> >.

KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **J Immunol**, v. 164, n. 4, p. 2016-20, Feb 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657653> >.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79-83, Feb 2008. ISSN 1096-0023 (Electronic)

1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218322> >.

KIZZA, F. N. et al. Prevalence of latent tuberculosis infection and associated risk factors in an urban African setting. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 165, 2015. ISSN 1471-2334 (Electronic)

1471-2334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25879423> >.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 405310, 2011. ISSN 1740-2530 (Electronic)

1740-2522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603213> >.

KORB, V. C.; CHUTURGOON, A. A.; MOODLEY, D. Mycobacterium tuberculosis: Manipulator of Protective Immunity. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 3, p. 131, 2016. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26927066> >.

KOZAKIEWICZ, L. et al. B cells regulate neutrophilia during Mycobacterium tuberculosis infection and BCG vaccination by modulating the interleukin-17 response. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p. e1003472, 2013. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853593> >.

KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 35-41, Feb 2004. ISSN 1044-5323 (Print)

1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751762> >.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bull World Health Organ**, v. 51, n. 1, p. 71-82, 1974. ISSN 0042-9686 (Print)

0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4218139> >.

KUMAR, A. et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon. **J Biol Chem**, v. 283, n. 26, p. 18032-9, Jun 27 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400743> >.

LALVANI, A.; PAREEK, M. Interferon gamma release assays: principles and practice. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 28, n. 4, p. 245-52, Apr 2010. ISSN 1578-1852 (Electronic)

0213-005X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783328> >.

LAMM, M. E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annu Rev Microbiol**, v. 51, p. 311-40, 1997. ISSN 0066-4227 (Print)

0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343353> >.

LATORRE, I.; DOMINGUEZ, J. Dormancy antigens as biomarkers of latent tuberculosis infection. **EBioMedicine**, v. 2, n. 8, p. 790-1, Aug 2015. ISSN 2352-3964 (Electronic)

2352-3964 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26425678> >.

LAW, K. et al. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 2, p. 799-804, Feb 1996. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564135> >.

LAWN, S. D.; CHURCHYARD, G. Epidemiology of HIV-associated tuberculosis. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 4, n. 4, p. 325-33, Jul 2009. ISSN 1746-6318 (Electronic)

1746-630X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19532072> >.

LAWN, S. D. et al. Short-term and long-term risk of tuberculosis associated with CD4 cell recovery during antiretroviral therapy in South Africa. **AIDS**, v. 23, n. 13, p. 1717-25, Aug 24 2009. ISSN 1473-5571 (Electronic)

0269-9370 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461502> >.

LEGESSE, M. et al. IgA response to ESAT-6/CFP-10 and Rv2031 antigens varies in patients with culture-confirmed pulmonary tuberculosis, healthy Mycobacterium tuberculosis-infected and non-infected individuals in a tuberculosis endemic setting, Ethiopia. **Scand J Immunol**, v. 78, n. 3, p. 266-74, Sep 2013. ISSN 1365-3083 (Electronic)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713613> >.

LENAERTS, A.; BARRY, C. E., 3RD; DARTOIS, V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. **Immunol Rev**, v. 264, n. 1, p. 288-307, Mar 2015. ISSN 1600-065X (Electronic)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703567> >.

LEYTEN, E. M. et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2052-60, Jul 2006. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931093> >.

MAGLIONE, P. J.; CHAN, J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 3, p. 676-86, Mar 2009. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19283721> >.

MAGLIONE, P. J. et al. Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during Mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol**, v. 180, n. 5, p. 3329-38, Mar 1 2008. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292558> >.

MAGLIONE, P. J.; XU, J.; CHAN, J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 178, n. 11, p. 7222-34, Jun 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513771> >.

MAHAIRAS, G. G. et al. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. **J Bacteriol**, v. 178, n. 5, p. 1274-82, Mar 1996. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631702> >.

MALIK, Z. A.; DENNING, G. M.; KUSNER, D. J. Inhibition of Ca(2+) signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. **J Exp Med**, v. 191, n. 2, p. 287-302, Jan 17 2000. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637273> >.

MANIVANNAN, S.; RAO, N. V.; RAMANATHAN, V. D. Role of complement activation and antibody in the interaction between Mycobacterium tuberculosis and human macrophages. **Indian J Exp Biol**, v. 50, n. 8, p. 542-50, Aug 2012. ISSN 0019-5189 (Print)

0019-5189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016491> >.

MASON, C. M. et al. CD4+ CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. **Clin Exp Immunol**, v. 148, n. 3, p. 537-45, Jun 2007. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362490> >.

MATTOS, A. M. et al. Increased IgG1, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-6 responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with tuberculosis are lower after chemotherapy. **Int Immunol**, v. 22, n. 9, p. 775-82, Sep 2010. ISSN 1460-2377 (Electronic)

0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624776> >.

MCHUGH, R. S.; SHEVACH, E. M. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. **J Allergy Clin Immunol**, v. 110, n. 5, p. 693-702, Nov 2002. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417876> >.

MEDRONHO R.A.; CARVALHO, D. M. B., K.V.; LUIZ, R.R.; WERNECK, G.L.
Epidemiologia. São Paulo, SP: 2003.

MEHER, A. K. et al. Mycobacterium tuberculosis H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. **FEBS J**, v. 273, n. 7, p. 1445-62, Apr 2006. ISSN 1742-464X (Print)

1742-464X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689931> >.

MEHER, A. K. et al. Analysis of complex formation and immune response of CFP-10 and ESAT-6 mutants. **Vaccine**, v. 25, n. 32, p. 6098-106, Aug 10 2007. ISSN 0264-410X (Print)

0264-410X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629379> >.

MINCH, K.; RUSTAD, T.; SHERMAN, D. R. Mycobacterium tuberculosis growth following aerobic expression of the DosR regulon. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35935, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558276> >.

MINEO, J. R. S., D.A.O.; SOPELETE, M.C.; LEAL, G.S.; VIDIGAL, L.H.G.; TAPIA, L.E.R.; BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia, MG.: 2005.

MITCHINSON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, p. 10-15, 1998.

MOGUES, T. et al. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Exp Med**, v. 193, n. 3, p. 271-80, Feb 5 2001. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157048> >.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-9, Jul 8 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241422> >.

MOTHÉ, B.; ANTAS, P. R. Z. Revisiting the Current Assays associated to Host Immune Responses against Tuberculosis Infection. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**, v. 3, 2015. ISSN 2329-8731.

MUKAMOLOVA, G. V. et al. A bacterial cytokine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 15, p. 8916-21, Jul 21 1998. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671779> >.

MUKAMOLOVA, G. V. et al. The rpf gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 611-21, Nov 2002. ISSN 0950-382X (Print)

0950-382X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410820> >.

MURRAY, P. J. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. **Trends Microbiol**, v. 7, n. 9, p. 366-72, Sep 1999. ISSN 0966-842X (Print)

0966-842X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470045> >.

MUSTAFA, A. S. et al. Multiple epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. **Clin Infect Dis**, v. 30 Suppl 3, p. S201-5, Jun 2000. ISSN 1058-4838 (Print)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875783> >.

NAYAK, S.; ACHARJYA, B. Mantoux test and its interpretation. **Indian Dermatol Online J**, v. 3, n. 1, p. 2-6, Jan 2012. ISSN 2249-5673 (Electronic)

2229-5178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23130251> >.

NICOL, M. P. et al. 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. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 9, p. 1301-8, May 1 2005. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15825033> >.

NOGUEIRA, L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 744-53, Mar 2010. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20017196> >.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 599-623, 2004. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032590> >.

PALMA-NICOLAS, J. P.; BOCANEGRA-GARCIA, V. [Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients]. **Arch Bronconeumol**, v. 43, n. 4, p. 225-32, Apr 2007. ISSN 0300-2896 (Print)

0300-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397587> >.

PAREKH, M. J.; SCHLUGER, N. W. Treatment of latent tuberculosis infection. **Thor Adv Respir Dis**, v. 7, n. 6, p. 351-6, Dec 2013. ISSN 1753-4666 (Electronic)

1753-4658 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056289> >.

PARK, H. D. et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 833-43, May 2003. ISSN 0950-382X (Print)

0950-382X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694625> >.

PERESI, E. et al. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 11, p. 942-9, Nov 2008. ISSN 1806-3756 (Electronic)

1806-3713 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19099101> >.

PEREZ, R. L. et al. Cytokine message and protein expression during lung granuloma formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 9, p. 795-804, Sep 2000. ISSN 1079-9907 (Print)

1079-9907 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032399> >.

PEYRON, P. et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 11, p. e1000204, Nov 2008. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002241> >.

PHUAH, J. et al. Effects of B Cell Depletion on Early Mycobacterium tuberculosis Infection in Cynomolgus Macaques. **Infect Immun**, v. 84, n. 5, p. 1301-11, May 2016. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26883591> >.

PILHEU, J. A. Tuberculosis 2000: problems and solutions. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 2, n. 9, p. 696-703, Sep 1998. ISSN 1027-3719 (Print)

1027-3719 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755922> >.

POLLOCK, J. M.; ANDERSEN, P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with Mycobacterium bovis in cattle. **Infect Immun**, v. 65, n. 7, p. 2587-92, Jul 1997. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199424> >.

PORTAELS, F. Epidemiology of mycobacterial diseases. **Clin Dermatol**, v. 13, n. 3, p. 207-22, May-Jun 1995. ISSN 0738-081X (Print)

0738-081X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521363> >.

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 709-17, Nov 2002. ISSN 0950-382X (Print)

0950-382X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410828> >.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian J Med Res**, v. 120, n. 4, p. 213-32, Oct 2004. ISSN 0971-5916 (Print)

0971-5916 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520479> >.

REDELMAN-SIDI, G.; SEPKOWITZ, K. A. IFN-gamma release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 188, n. 4, p. 422-31, Aug 15 2013. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23262514> >.

RENSHAW, P. S. et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. **EMBO J**, v. 24, n. 14, p. 2491-8, Jul 20 2005. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973432> >.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 4, p. 818-23, Jul 2002. ISSN 1071-412X (Print)

1071-412X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093679> >.

ROACH, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4620-7, May 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971010> >.

RODRIGUES, M. F. et al. Apoptosis of macrophages during pulmonary Mycobacterium bovis infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e691-9, Sep 2009. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740330> >.

ROOK, G. A. et al. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. **Trends Immunol**, v. 25, n. 9, p. 483-8, Sep 2004. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324741> >.

ROUPIE, V. et al. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of Mycobacterium tuberculosis in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 2, p. 941-9, Feb 2007. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145953> >.

ROY, E. et al. Therapeutic efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin in Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 6101-9, Sep 2005. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113331> >.

RUHWALD, M. et al. Evaluating the potential of IP-10 and MCP-2 as biomarkers for the diagnosis of tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 32, n. 6, p. 1607-15, Dec 2008. ISSN 1399-3003 (Electronic)

0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684849> >.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 39-47, Jan 2007. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160001> >.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, p. 943-8, Sep 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19692995> >.

RUSTAD, T. R. et al. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1502, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18231589> >.

SADEK, M. I. et al. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 19, n. 3, p. 513-21, Sep 1998. ISSN 1044-1549 (Print)

1044-1549 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730880> >.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 374-80, Aug 2005. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963709> >.

SAÚDE, M. D. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília p.288. 2011

SAÚDE, M. D. S.-S. D. V. E. **Boletim Epidemiológico**. Brasília. 2014

SAÚDE., M. D. **Guia de Vigilância epidemiológica**. p.816. 2007

SAÚDE/FUNASA, M. D. **Tuberculose. In: doenças infecciosas e parasitárias.** Brasília, p.197. 2000

SAÚDE/FUNASA, M. D. **Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço.** Brasília, p.236. 2002

SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J Immunol**, v. 150, n. 7, p. 2920-30, Apr 1 1993. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8454864> >.

SCHUCK, S. D. et al. Identification of T-cell antigens specific for latent mycobacterium tuberculosis infection. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5590, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440342> >.

SENOPUTRA, M. A. et al. Diagnostic value of antibody responses to multiple antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in active and latent tuberculosis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 3, p. 278-85, Nov 2015. ISSN 1879-0070 (Electronic)

0732-8893 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26307672> >.

SEPKOWITZ, K. A. et al. Tuberculosis in the AIDS era. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 2, p. 180-99, Apr 1995. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621399> >.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 421-52, 2008. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303997> >.

SERRA-VIDAL, M. M. et al. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Front Microbiol**, v. 5, p. 517, 2014. ISSN 1664-302X (Electronic)

1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339944> >.

SIRECI, G. et al. Anti-16-kilodalton mycobacterial protein immunoglobulin m levels in healthy but purified protein derivative-reactive children decrease after chemoprophylaxis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 9, p. 1231-4, Sep 2007. ISSN 1556-6811 (Print)

1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626158> >.

SOYSAL, A. et al. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of M. tuberculosis infection. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 12, n. 1, p. 50-6, Jan 2008. ISSN 1027-3719 (Print)

1027-3719 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173877> >.

SPENCER, J. S. et al. Comparative analysis of B- and T-cell epitopes of Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis culture filtrate protein 10. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3161-70, Jun 2004. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155617> >.

SRIVASTAVA, S.; ERNST, J. D. Cell-to-cell transfer of M. tuberculosis antigens optimizes CD4 T cell priming. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 6, p. 741-52, Jun 11 2014. ISSN 1934-6069 (Electronic)

1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24922576> >.

STEINGART, K. R. et al. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD009593, 2013. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440842> >.

SU, W. L. et al. Association of reduced tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukin-1beta (IL-1beta) but increased IL-10 expression with improved chest radiography in patients with pulmonary tuberculosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 2, p. 223-31, Feb 2010. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007364> >.

SZABO, S. J. et al. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. **J Exp Med**, v. 185, n. 5, p. 817-24, Mar 3 1997. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120387> >.

TALAAT, A. M. et al. The temporal expression profile of Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4602-7, Mar 30 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070764> >.

TANEJA, N. K. et al. Mycobacterium tuberculosis transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10860, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523728> >.

TAYLOR, J. L. et al. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6135-44, Nov 2006. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982845> >.

TEBRUEGGE, M. et al. Mycobacteria-Specific Cytokine Responses Detect Tuberculosis Infection and Distinguish Latent from Active Tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 192, n. 4, p. 485-99, Aug 15 2015. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030187> >.

TEITELBAUM, R. et al. A mAb recognizing a surface antigen of Mycobacterium tuberculosis enhances host survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15688-93, Dec 22 1998. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861031> >.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 3, p. 323-34, May-Jun 2007. ISSN 1806-3756 (Electronic)

1806-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906795> >.

TJARNLUND, A. et al. Polymeric IgR knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild-type mice. **Int Immunol**, v. 18, n. 5, p. 807-16, May 2006. ISSN 0953-8178 (Print)

0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569672> >.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 455-62, Dec 2010. ISSN 1879-0305 (Electronic)

1359-6101 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21075039> >.

TREBUCQ, A. et al. Xpert(R) MTB/RIF for national tuberculosis programmes in low-income countries: when, where and how? **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 12, p. 1567-72, Dec 2011. ISSN 1815-7920 (Electronic)

1027-3719 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005110> >.

TUFARIELLO, J. M.; JACOBS, W. R., JR.; CHAN, J. Individual Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 515-26, Jan 2004. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688133> >.

TUFARIELLO, J. M. et al. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis. **Infect Immun**, v. 74, n. 5, p. 2985-95, May 2006. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622237> >.

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **J Pathol**, v. 208, n. 2, p. 261-9, Jan 2006. ISSN 0022-3417 (Print)

0022-3417 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16362982> >.

VAN PINXTEREN, L. A. et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 7, n. 2, p. 155-60, Mar 2000. ISSN 1071-412X (Print)

1071-412X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702486> >.

VORDERMEIER, H. M. et al. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. **Clin Exp Immunol**, v. 106, n. 2, p. 312-6, Nov 1996. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918578> >.

VRANJAC, A. Mudança no tratamento da Tuberculose. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 196-198, 2010.

WALLGREN, A. The time-table of tuberculosis. **Tubercle**, v. 29, n. 11, p. 245-51, Nov 1948. ISSN 0041-3879 (Print)

0041-3879 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18101320> >.

WALZL, G. et al. Immunological biomarkers of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 5, p. 343-54, May 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21475309> >.

WANG, L. et al. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. **Thorax**, v. 57, n. 9, p. 804-9, Sep 2002. ISSN 0040-6376 (Print)

0040-6376 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200526> >.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 139-63, 2001. ISSN 0066-4227 (Print)

0066-4227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544352> >.

WELCH, R. J.; LAWLESS, K. M.; LITWIN, C. M. Antituberculosis IgG antibodies as a marker of active Mycobacterium tuberculosis disease. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 4, p. 522-6, Apr 2012. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301692> >.

WELDINGH, K. et al. Assessing the serodiagnostic potential of 35 Mycobacterium tuberculosis proteins and identification of four novel serological antigens. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 57-65, Jan 2005. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634951> >.

WHO. **Tuberculosis**. Geneva - Switzerland, p.104. 2002

_____. **Commercial Serodiagnostic Tests for Diagnosis of Tuberculosis Policy Statement**. p.26. 2011

_____. **Global Tuberculosis Control** Geneva - Switzerland. 2012

_____. **Global tuberculosis report 2013** Geneva. 2013

_____. **Global Tuberculosis Report** Geneva - Switzerland, p.204. 2015

WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105-17, Jan 2006. ISSN 1074-7613 (Print)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413927> >.

WOLF, A. J. et al. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. **J Exp Med**, v. 205, n. 1, p. 105-15, Jan 21 2008. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18158321> >.

WOLF, A. J. et al. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **J Immunol**, v. 179, n. 4, p. 2509-19, Aug 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675513> >.

WU, X. et al. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from Mycobacterium tuberculosis. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 19-20, p. 1520-8, Oct 9 2010. ISSN 1873-3492 (Electronic)

0009-8981 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599865> >.

XU, J. N.; CHEN, J. P.; CHEN, D. L. Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of Mycobacterium tuberculosis composed of the 10-kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 4, p. 536-44, Apr 2012. ISSN 1556-679X (Electronic)

1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357648> >.

YUAN, Y.; CRANE, D. D.; BARRY, C. E., 3RD. Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. **J Bacteriol**, v. 178, n. 15, p. 4484-92, Aug 1996. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755875> >.

ZHANG, M. M. et al. Identification of RD5-encoded Mycobacterium tuberculosis proteins as B-cell antigens used for serodiagnosis of tuberculosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 738043, 2012. ISSN 1740-2530 (Electronic)

1740-2522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701501> >.

ZHANG, X. et al. Generation of Mycobacterium tuberculosis-specific recombinant antigens and evaluation of the clinical value of antibody detection for serological diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Int J Mol Med**, v. 31, n. 3, p. 751-7, Mar 2013. ISSN 1791-244X (Electronic)

1107-3756 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23338746> >.

ANEXO

Publicações alcançadas no período do doutorado, relacionadas com o diagnóstico sorológico na Tuberculose, Hanseníase e Leishmaniose Visceral Canina (LVC), e um artigo (minireview) envolvendo o estudo de mecanismos relacionados ao estado de latência do *Mycobacterium tuberculosis*.

- 1) **Detection of IgG1 antibodies against Mycobacterium tuberculosis DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy.** Ana Márcia Menezes Mattos, Alexandre Silva Chaves, Kees L.M.C. Franken, Bárbara Bruna Muniz Figueiredo, Ana Paula Ferreira, Tom H. M. Ottenhoff, Henrique Couto Teixeira. **Tuberculosis.** Este estudo sugere que a detecção de anticorpos IgG1 específicos contra Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867 pode representar uma ferramenta adicional no diagnóstico de tuberculose ativa. Além disso, anticorpos IgG1 contra Rv0717, Rv3353, Rv1733, Rv2628, Rv2029 e Rv0867, aumentados após a introdução da quimioterapia, podem servir como biomarcadores para monitorar o tratamento da tuberculose.

- 2) **Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region.** Angélica da Conceição Oliveira Coelho Fabri, Ana Paula Mendes Carvalho, Sérgio Araujo, Luiz /ricardo Goulart, Ana Márcia Menezes de Mattos, Henrique Couto Teixeira, Isabela Maria Bernardes Goulart, Malcolm S. Duthie, Rodrigo Correa-Oliveira, Francisco Carlos Félix Lana. **BMC Infectious Diseases.** Neste estudo, altas taxas de anticorpos contra os antígenos LID-1, NDO-LID, NDO-HSA e PGL-1 foram observados entre vários grupos da população. Altos níveis de anticorpos específicos para os antígenos estudados, também foram observados nos pacientes multibacilares (MB) e nos contatos domiciliares de pacientes multibacilares (HHC). Além disso, foi observada uma correlação positiva entre sorologia e o índice bacteriano. Os antígenos LID-1 e NDO-LID apresentaram maior capacidade para identificar HHC e indivíduos infectados com *M. leprae* na

população em geral. PGL-1 apresentou maior grau de positividade que NDO-HSA para todas as formas de hanseníase e para HHC. Resultados sugerem que o antígeno NDO-LID pode ser importante na vigilância de HHC e da população em geral. Além disso, esses dados fornecem evidências de que todos os antígenos testados são instrumentos relevantes para apoiar a classificação operacional da hanseníase e também podem ser utilizados para identificar os indivíduos infectados com *M. leprae*. Os resultados deste estudo indicam a necessidade de maior vigilância nos serviços de saúde em regiões com alta endemicidade para hanseníase, visto que muitos casos atualmente não são diagnosticado e estes casos, provavelmente, contribuem para a transmissão contínua de *M. leprae* e a manutenção da doença como um problema de saúde.

- 3) **Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis.** Lily Abad, Caroline Almeida, Ana Márcia Mattos, Ana Carolina Mendonça, Márcia José Alves, Aimara Pinheiro, Renato Porrozzi, Elfadil Abass, Ulrich Steinhoff. **Acta Tropica** (Submetido). O diagnóstico leishmaniose visceral canina (LVC) ainda precisa ser melhorado para alcançar uma taxa de detecção mais precisa. Neste estudo, a acurácia do antígeno rKLO8, uma nova proteína recombinante, com atividade de cinesina, obtida a partir de *L. donovani*, foi investigada e comparada com o antígeno de referência rK26, usando o método de ELISA. rKLO8 mostrou um desempenho semelhante em comparação com rK26. Além disso, a combinação de rKLO8 com rK26 no mesmo teste mostrou um melhor desempenho para o diagnóstico da LVC. Estes resultados sugerem uma potencial aplicação da proteína rKLO8 para melhorar o diagnóstico da LVC.

- 4) **Challenging *Mycobacterium tuberculosis* dormancy mechanisms and their immunodiagnostic potential.** Alexandre Silva Chaves, Michele Fernandes Rodrigues, Ana Márcia Menezes de Mattos, Henrique Couto Teixeira. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. Neste artigo de revisão discutimos brevemente alguns mecanismos pelos quais o *M. tuberculosis* é

capaz de manter-se em um perfil de baixo metabolismo, permitindo-lhe sobreviver em um ambiente agressivo como é frequentemente encontrado no hospedeiro. Esses mecanismos funcionam sob controle genético, e os seus produtos podem afetar a estrutura bacteriana, bem como seu metabolismo, conduzindo a um meio de escapar do sistema imune do hospedeiro. O principal ponto a ser levado em consideração é que a infecção latente é realmente parte de um espectro maior em que se insere o ciclo de vida de *M. tuberculosis*, e isto deve ser levado em consideração quando se analisa a resposta imunológica global contra o patógeno, bem como na pesquisa de novas ferramentas de diagnóstico para controle da tuberculose.