

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Imunologia / Genética e Biotecnologia

Ana Márcia Menezes de Mattos

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS PARA OS
ANTÍGENOS ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa E HBHA EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE ATIVA: IMPORTÂNCIA NO DIAGNÓSTICO E
EFEITO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Juiz de Fora

2009

Ana Márcia Menezes de Mattos

Detecção de anticorpos IgG específicos para os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA em pacientes com tuberculose ativa: importância no diagnóstico e efeito do tratamento quimioterápico.

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora

2009

Mattos, Ana Márcia Menezes de.

Detecção de anticorpos IgG específicos para os atígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA em pacientes com tuberculose ativa : importância no diagnóstico e efeito do tratamento quimioterápico / Ana Márcia Menezes de Mattos. – 2009.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Tuberculose. 2. Anticorpos. I. Título.

CDU 616.24-002.5

Ana Márcia Menezes de Mattos

**Detecção de anticorpos IgG específicos para os antígenos ESAT-6,
CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA em pacientes com tuberculose ativa:
importância no diagnóstico e efeito do tratamento quimioterápico.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Aprovada em 23 de junho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Prof^a. Dra Maria Aparecida de Souza
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho à minha família,
Sebastião e Gilza, meus pais, por se dedicarem
tanto para a minha formação;
A minha avó *Odette* pelo carinho e incentivo sempre;
Ao meu irmão *Wallace* e minha irmã *Maryangela*,
pela torcida;
Ao *Fabício*, meu marido, pelo amor, paciência e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado a oportunidade de estudar, de desenvolver este trabalho e por colocar ao meu lado pessoas imprescindíveis, como minha família, meu orientador, colaboradores e amigos que de formas diferentes tanto me ajudaram;

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

Ao meu marido Fabrício pela paciência, dedicação e companherismo nos momentos difíceis e também naqueles de alegria;

Ao meu irmão Wallace, minha irmã Maryangela, meu cunhado Fábio e meu sobrinho Igor pelo apoio fundamental para esta conquista;

A minha avó Odette, aos meus tios e primos pela torcida;

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

À Professora Dra. Maria Aparecida de Souza que muito contribuiu para a realização deste trabalho;

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

Ao Professor Dr. Márcio José Martins Alves pela orientação estatística;

Aos professores da Parasitologia Dra Elaine Coimbra, Dra Clarice Abramo e ao Professor Pedro Paulo pelas oportunidades de aprendizado e incentivo sempre;

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

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

Ao Dr. Henrique da Embrapa e sua esposa Marlene por gentilmente me concederem o soro de cabra;

Aos colegas da Parasitologia Fernanda, Carolina, Ivone e Cristina pelos dias gostosos de convivência;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia-UFJF: Caroline, Isabelly, Luciano, Bruno, Lívia, Alyria, Ana Cláudia, Sandra, Caio, Alice, Michele e Marina pela amizade e ajuda neste trabalho;

Em especial a Caroline pelo auxílio na construção do artigo;

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

À todos aqueles que gentilmente doaram suas amostras sanguíneas para 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 detecção de anticorpos específicos pode representar um instrumento valioso no diagnóstico da tuberculose (TB). Neste trabalho níveis de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6, CFP10, 85B, 16kDa e HBHA do *M. tuberculosis* foram avaliados em 102 amostras de soro de pacientes com TB pulmonar agrupados como: 1) pacientes com TB ativa (n=33); 2) pacientes com 1 a 3 meses de tratamento (n=47); 3) pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (n=22). Foi incluído um grupo controle formado por 38 indivíduos saudáveis vacinados com BCG. Níveis de IgG1, IgG2 e IgG4 foram quantificados no soro de pacientes com TB ativa contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10. Foram detectados níveis elevados de anticorpos IgG contra ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA no soro de pacientes com TB ativa em comparação com o grupo de pacientes que completaram o tratamento ($p < 0,05$), e em relação ao grupo controle sadio ($p < 0,05$). Níveis de IgG contra 16kDa mostrou um pico após 1-3 meses de quimioterapia. A análise da curva ROC indicou sensibilidade de 85% (ESAT-6), 94% (CFP-10), 91% (85B), 61% (16K) e 70% (HBHA), e especificidade de 89% (ESAT-6), 87% (CFP-10), 82% (85B), 89% (16K) e 84% (HBHA). A área sob a curva ROC foi maior para os antígenos ESAT-6 (área = 0,946, IC 95%: 0,865 a 0,985) e CFP-10 (área = 0,942, IC 95%: 0,859 a 0,983), quando comparada com os antígenos 16kDa (área = 0,809, IC 95%: 0,699 a 0,893) e HBHA (área = 0,805, IC 95%: 0,694 a 0,890). O antígeno 85B (área = 0,909, IC 95%: 0,817 a 0,964) não apresentou diferença estatística em relação ao antígeno 16kDa na análise da curva ROC. Uma predominância de anticorpos IgG1 contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10 foi observada no soro de pacientes com TB ativa. A detecção de anticorpos IgG contra ESAT-6 e CFP-10 pode representar um instrumento adicional para o diagnóstico da tuberculose, e pode ser potencialmente útil como indicativo do sucesso do tratamento.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Anticorpos. Resposta humoral. ESAT-6. CFP-10. 85B. HBHA. 16kDa.

ABSTRACT

Detection of specific antibodies may represent a valuable tool in the diagnosis of tuberculosis (TB). In this work levels of IgG antibodies against ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa and HBHA *M. tuberculosis* antigens were measured in 102 serum samples from pulmonary TB patients grouped as: 1) active TB patients (n=33); 2) patients who had received 1 to 3 months of anti-TB chemotherapy (n=47); and, 3) patients who had completed 6 months of chemotherapy (n=22). A control group formed by 38 BCG vaccinated healthy controls was included. levels of IgG1, IgG2 and IgG4 were also quantified in the serum of patients with active TB against the ESAT-6 and CFP-10 antigens. Elevated levels of IgG against ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa and HBHA were detected in active TB patients in comparison with the group of patients that completed the treatment ($p < 0,05$) and in comparison with the healthy control group ($p < 0,05$). Levels of IgG against 16kDa had a peak after 1-3 months of chemotherapy. The ROC curves indicated sensitivity of 85% (ESAT-6), 94% (CFP-10), 91% (85B), 61% (16kDa) and 70% (HBHA), and specificity of 89% (ESAT-6), 87% (CFP-10), 82% (85B), 89% (16K) e 84% (HBHA). The area under the ROC curve was larger when the ESAT-6 (area = 0.956, IC 95%: 0.865 to 0.985) and CFP-10 (area = 0.942, IC 95% per cent: 0.859 to 0.983) antigens were used, in comparison to 16kDa (area = 0.809, IC 95%: 0.699 to 0.893) and HBHA (área = 0,805, IC 95%: 0,694 to 0,890). The 85B antigen (área = 0,909, IC 95%: 0,817 to 0,964) did not exhibit statistic difference in relation to the 16kDa antigen in ROC curve analysis. A predominant detection of IgG1 against ESAT-6 and CFP-10 was observed in active TB patients. Detection of IgG antibodies to ESAT-6 and CFP-10 may represent an additional tool in TB diagnosis, and may be potentially useful as indicative of the treatment success.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Antibodies. Humoral response. ESAT-6. CFP-10. Rv1419. 85B. HBHA. 16kDa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Titulação de anticorpos IgG anti-ESAT-6 em diferentes diluições de soro de pacientes com tuberculose pulmonar.....	43
Figura 2	Níveis de anticorpos IgG contra ESAT-6 e CFP-10 em pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar.....	44
Figura 3	Níveis de anticorpos IgG contra 85B (A), 16kDa (B) e HBHA (C) em pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar.....	45
Figura 4	Níveis de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10 em grupos de pacientes com tuberculose pulmonar.....	47
Figura 5	Níveis de anticorpo IgG contra os antígenos 85B, 16kDa e HBHA em grupos de pacientes com tuberculose pulmonar.....	48
Figura 6	Níveis de anticorpos IgM contra os antígenos ESAT-6 e 16kDa em grupos de pacientes com tuberculose pulmonar.....	49
Figura 7	Comparação dos antígenos ESAT-6, CFP-10 e HBHA, através da curva ROC (receiver operator characteristic).....	51
Figura 8	Comparação dos antígenos ESAT-6, CFP-10, 16kDa e HBHA, através da curva ROC (receiver operator characteristic).....	52
Figura 9	Comparação dos antígenos 85B, 16kDa e HBHA, através da curva ROC (receiver operator characteristic).....	53
Figura 10	Deteção de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG4 contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10 em pacientes com tuberculose pulmonar ativa.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas dos pacientes com tuberculose.....	43
Tabela 2	Sensibilidade e especificidade dos antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA no sorodiagnóstico da tuberculose pulmonar.....	54

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
Ag85	Complexo antigênico 85
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CR	Receptor do complemento
CD	“Clusters of differentiation” / moléculas expressas na superfície de leucócitos
CFP-10	“Culture filtrate antigen” / Antígeno de filtrado de cultura
CFU	Unidades formadoras de colônias
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	“Enzyme linked immuno sorbent assay” / Ensaio de absorção imunoenzimático
ELISPOT	“Enzyme linked immunospot assay” / Imuno-sinal enzimático
ESAT-6	“Early secreted antigenic target -6” / Alvo antigênico precocemente secretado
Fc	Fragmento cristalizável
HBHA	“Heparin binding hemagglutinin adhesin” / Adesina hemaglutinina que liga heparina
HIV	“Human immunodeficiency virus” / Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HSP	“Heat Shock Proteins” / Proteínas de choque térmico
IE	“ELISA index” / Índice ELISA
IFN- γ	Gamma-interferon” / Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
IL-27	Interleucina 27
kDa	Kilo-Dalton
LAM	Liporabinomanan
mAb _s	Anticorpos monoclonais
MDR	Multi-drogas resistentes
MHC	“Major histocompatibility complex” / Complexo principal de histocompatibilidade
CXCL9	Monocina induzida por interferon-gama
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
MOTT	Micobactérias outras que <i>M. tuberculosis</i>
NK	“Natural Killers Cells” / Células matadoras naturais
nm	Nanômetro
NO	“Nitric oxide” / Óxido nítrico
NRAMP1	“Natural Resistance Associated Protein” / Proteína associada à resistência natural
NTM	Micobactérias não <i>M. tuberculosis</i>
OPD	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	Fator de transformação do crescimento-beta

Th1	Linfócitos T auxiliares com padrão de secreção de citocinas do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares com padrão de secreção de citocinas do tipo 2
TLR _s	“Toll like receptors” / Receptores da célula T
TNF- α	“Tumor necrosis factor-alpha” / Fator de necrose tumoral alfa
T $\gamma\delta$	Linfócitos T que expressam receptores gamma/ delta
Treg	Células T regulatórias
UT	Unidades de tuberculina
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
1.3 TUBERCULOSE.....	17
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	20
1.5 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	26
1.6 ANTÍGENOS DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	37
3.2 ANTÍGENOS ESTUDADOS.....	38
3.3 COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO.....	38
3.4 PADRONIZAÇÃO DOS TESTES.....	39
3.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	39
3.6 RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC CURVE – CURVA ROC.....	40
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS	42
4.1 PADRONIZAÇÃO DO ELISA.....	42
4.2 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ACORDO COM A FORMA CLÍNICA.....	44
4.3 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE ACORDO COM O TEMPO DE QUIMIOTERAPIA.....	46
4.4 ESTUDO DAS CURVAS ROC DOS TESTES DE ELISA PARA OS ANTÍGENOS ESAT-6, CFP-10, Ag85B, 16kDa e HBHA DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
4.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.....	54
4.6 AVALIAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgG PARA OS ANTÍGENOS ESAT-6 e CFP-10	55
5 DISCUSSÃO	56

6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A tuberculose (TB) permanece como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (MURRAY, 1999). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, sob o risco de desenvolver a enfermidade (Ministério da Saúde, 2007). A tuberculose é a segunda principal causa de mortes por doenças infecciosas depois da AIDS, levando ao óbito aproximadamente 1,8 milhões de pessoas anualmente (WHO, 2007). O número de novos casos de TB por ano é estimado em cerca de 8,8 milhões, sendo que 80% estão concentrados em 22 países. Bangladesh, China, Índia, Indonésia e Paquistão, países mais populosos da Ásia, representam a metade dos casos de TB no mundo. A África, em particular a região do Sub-Saara, apresenta o mais alto índice de tuberculose (350 casos por 100.000 habitantes). O Brasil, com estimados 100.000 novos casos por ano, ocupa a 15ª posição entre os países com maior incidência de TB no mundo (WHO, 2007).

Nos países desenvolvidos a tuberculose é mais frequente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e imigrantes estrangeiros. Nos países em desenvolvimento, estima-se que ocorram 7,5 milhões de novos casos, atingindo a todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (15-54 anos) (Ministério da Saúde, 2007).

O Brasil apresenta números que são extremamente preocupantes seja considerando a situação do país como um todo ou apenas por regiões. Em 2000 foram notificados 82.249 casos novos, sendo 38.690 no sudeste, 23.196 no nordeste, 9.281 no sul, 5.901 no norte e 3.522 no centro-oeste. E a distribuição de formas clínicas, no Brasil, mostrou: 60,7% de pacientes com TB pulmonar, baciloscopia positiva; 24,9% com TB pulmonar sem confirmação bacteriológica e 14,4% com TB extrapulmonar (HIJJAR et al., 2001). Como a tuberculose é uma doença com profundas raízes sociais, relacionadas à má distribuição de renda e à pobreza, estas taxas variam de acordo com as regiões (Ministério da Saúde, 2007).

Com o surgimento, em 1981, da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), vem-se observando, tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, crescente número de casos notificados de tuberculose em

peças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esta associação (HIV/TB) constitui, nos dias atuais, um sério problema de saúde pública, podendo levar ao aumento da morbidade e mortalidade pela tuberculose em muitos países (Ministério da Saúde, 2007). Além disso, A infecção com o vírus HIV pode contribuir 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, FOLKERS e FALCI, 2004).

Outro grande problema que reforça a gravidade da TB no mundo é o aumento do número de pacientes com tuberculose multi-drogas resistente (MDR). Em 2000 foi estimado que 3,2% dos novos casos de tuberculose no mundo pertenciam aos casos de MDR (ESPINAL, 2003). Estes dados mostram a importância do diagnóstico precoce e tratamento efetivo, bem como de estratégias de prevenção e controle para a tuberculose (VALADAS e ANTUNES, 2005).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Identificado por Robert Koch em 1882, *M. tuberculosis* é a espécie mais importante do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que engloba *M. tuberculosis* (MTB), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. Canetti* e *M. microti* (MORRONE et al., 2003; PALMAS-NICOLÁS e BOCANEGRA-GARCÍA, 2007). No entanto, outras micobactérias ocasionalmente determinam doença, principalmente nos imunodeprimidos, nos idosos, e nos portadores de broncopneumopatias crônicas (MORRONE et al., 2003).

As micobactérias podem ser divididas em três grupos com base nos critérios clínicos. O primeiro grupo inclui os patógenos típicos ou estritos ao homem e alguns animais, dentre eles os membros do complexo *M. tuberculosis* e *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 saprofitas, não patogênicas ou excepcionalmente patogênicas (PORTAELS, 1995). Essas micobactérias foram inicialmente denominadas anônimas e atualmente são conhecidas coletivamente como atípicas, micobactérias outras que *M. tuberculosis* (MOTT), micobactérias não *M. tuberculosis* (NTM) ou micobactérias do meio ambiente (PORTAELS, 1995; INDERLIED, KEMPER e BERMUDEZ, 1993).

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 (Ministério da Saúde, 2002). *M. tuberculosis* é um patógeno aeróbico obrigatório o qual tem preferência pelos tecidos pulmonares ricos em oxigênio (RAJA, 2004). Devido à característica de sua parede celular ser rica em lipídios, os bacilos corados são refratários à descoloração por soluções ácidas, daí serem chamados de bacilos álcool-ácido resistentes (TRABULSI, TOLEDO e SILVA, 1991).

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. Podem ficar em estado de dormência por longos períodos, fator responsável pela reativação da infecção (Ministério da Saúde, 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 apresentam um alto conteúdo lipídico em sua parede celular, sendo este responsável por importantes efeitos biológicos como a indução da formação de granuloma. O *M. tuberculosis* é, de modo geral, resistente à ação de agentes químicos e sensível à ação de agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta (Ministério da saúde, 2002).

1.3 Tuberculose

1.3.1 Transmissão

Os bacilos do *M. tuberculosis* são facilmente transmitidos de pessoa para pessoa (BOOM et al., 2003). O paciente com a tuberculose pulmonar pode exalar o bacilo através da tosse, espirro, fala ou saliva (WHO, 2007). Calcula-se que, durante

um ano, numa comunidade, uma fonte de infecção poderá infectar, em média, 10 a 15 pessoas que com ela tenham tido contato (Ministério da saúde, 2002).

A tuberculose pode ser transmitida através das seguintes formas: inalação de partículas contendo o *M. tuberculosis*; ingestão de material contaminado, usualmente o leite; e inoculação direta, ocorrendo entre trabalhadores da área de saúde. A transmissão por inalação é a forma predominante em todo o mundo, especialmente em países onde é rotineiro o uso do leite pasteurizado, que elimina o *M. bovis* (SEPKOWITZ, et al., 1995).

A intensidade do contato com o doente é uma das condições que faz com que a tuberculose esteja associada à população de baixa renda. Nesta camada social, famílias numerosas convivem muito proximamente em casas pequenas, mal ventiladas e úmidas. A fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente com tuberculose pulmonar, lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão no ar, ou porque são pequenas ou porque sofrem evaporação. Somente os núcleos secos das gotículas com diâmetros de até 5 μ m e com 1 a 2 bacilos em suspensão podem atingir os bronquíolos e alvéolos e iniciarem a multiplicação. As gotículas médias são, na sua maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo mucociliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminado nas fezes. Os que se depositam nas roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis e, por isto, não desempenham papel importante na transmissão (Ministério da Saúde, 2007).

1.3.2 Doença

A tuberculose atinge, principalmente, os pulmões. A forma extrapulmonar é mais rara, podendo afetar qualquer órgão ou tecido, surgindo com maior frequência em crianças e indivíduos com infecção por HIV (Ministério da Saúde, 2006). A forma extrapulmonar ocorre em cerca de 15% dos casos de pacientes com tuberculose (RAJA, 2004).

A infecção pelo *M. tuberculosis* apresenta-se sob duas formas: a forma primária que ocorre em indivíduos que ainda não tiveram contato com o bacilo (primoinfecção), sendo, portanto, mais comum em crianças. A forma secundária que

se desenvolve a partir de uma nova infecção, reinfecção exógena, ou da reativação de bacilos latentes, reinfecção endógena (BOMBARDA et al., 2001).

A infecção primária envolve a replicação do *M. tuberculosis* dentro dos macrófagos alveolares dos espaços terminais dos pulmões. Após multiplicação intracelular, desencadeia-se o processo de imunidade celular (Ministério da Saúde, 2000). Os macrófagos ativados aglomeram-se ao redor dos bacilos, transformando-se, parte deles, em células epitelióides e células gigantes. Clones de linfócitos formam um manto periférico ao redor dos macrófagos, constituindo o granuloma, cuja função básica é a de barreira à disseminação do bacilo a outras células do tecido. O conjunto de granulomas formados recebe o nome de nódulo de Ghon. Ao conjunto formado pelo nódulo de Ghon, linfangite e linfadenite dá-se o nome de complexo primário da tuberculose que, dependendo da carga bacteriana, da virulência dos bacilos e do grau de hipersensibilidade e resistência do hospedeiro, pode evoluir para a cura ou para a doença (BOMBARDA et al., 2001).

A doença primária evolui a partir do foco pulmonar (processo pneumônico parenquimatoso) ou, com maior freqüência, 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 e para outros órgãos (BOMBARDA et al., 2001). Quando ocorre disseminação por via hematogênica para cérebro, rins, corpos vertebrais, linfonodos e região apical dos pulmões, a doença, evolui para o quadro de tuberculose primária progressiva, tuberculose miliar ou tuberculose disseminada (Ministério da Saúde, 2000).

A tuberculose pós-primária ou secundária é considerada uma reativação de lesões prévias de bacilos dormentes e causam uma infecção granulomatosa crônica. Frequentemente essa reativação está relacionada com períodos de imunodepressão. Histologicamente a tuberculose secundária é caracterizada por presença de necrose caseosa que produz lesões localizadas (ANDREU et al., 2004).

M. tuberculosis determina três tipos básicos de reações inflamatórias: exsudativa, produtiva e necrótica. A inflamação exsudativa é encontrada principalmente na infecção primária, antes do desenvolvimento de hipersensibilidade tardia. A reação produtiva se caracteriza pela formação de granulomas ou tubérculos, que são constituídos de macrófagos (células epitelióides), linfócitos e outras células. Os granulomas geralmente aparecem quando a quantidade de

bacilos, ou de antígenos, no sítio de infecção é baixa e a hipersensibilidade tardia apresenta níveis elevados (TRABULSI, TOLEDO e SILVA, 1991). A reação necrótica ocorre, basicamente, quando a quantidade de antígeno no local da infecção e a hipersensibilidade dos tecidos são bastante elevados. A necrose encontrada na tuberculose é do tipo caseoso, se caracterizando ainda por ser incompleta e pobre em oxigênio. Embora possa ocorrer durante a infecção primária, a necrose caseosa é característica da tuberculose secundária (TRABULSI, TOLEDO e SILVA, 1991).

1.4 Resposta imunológica

1.4.1 Resistência e susceptibilidade

A história natural da tuberculose mostra que muitas pessoas são resistentes à infecção, provavelmente, devido à capacidade de desenvolver uma eficiente resposta imune ao *M. tuberculosis*. Entretanto, muitos indivíduos são incapazes de livrar-se completamente da bactéria, podendo desenvolver a doença ou permanecer com a infecção latente. Dos indivíduos expostos ao *M. tuberculosis*, 10 a 30% tornam-se infectados. Destes, somente 5 a 10% desenvolvem a tuberculose ativa (NORTH e JUNG, 2004).

Entre os indivíduos imunocompetentes susceptíveis com tuberculose ativa, 85% apresentam exclusivamente a forma pulmonar. Nos indivíduos imunocomprometidos, tais como pessoas infectadas com HIV, a tuberculose freqüentemente é mais agressiva e pode tornar-se disseminada (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007).

A probabilidade de o indivíduo infectado desenvolver a doença depende de múltiplas causas, destacando-se dentre elas, as condições sócio-econômicas e algumas condições médicas, tais como, diabetes mellitus, uso prolongado de corticosteróide ou outros imunossupressores, uso de drogas e infecção pelo vírus HIV. Além disso, a evolução da doença pode depender da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas do hospedeiro (Ministério da Saúde, 2007). Estudos têm mostrado uma associação entre a TB e genes que codificam proteínas como NRAMP1 e receptores de vitamina D, que estão envolvidos na resistência associada a fagocitose e destruição do *M. tuberculosis* pelos macrófagos. Tais pesquisas sugerem que alguns indivíduos podem apresentar predisposição

genética à TB. Entretanto, até o momento, a contribuição genética na incidência global da TB não foi avaliada devido à grande dificuldade em separar a influência dos fatores ambientais da predisposição genética à TB (DAVIES e GRANGE, 2001; FRIEDEN et al., 2003).

1.4.2 Imunidade celular frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

Considerando a resposta imune inata, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao sítio de multiplicação do bacilo *M. tuberculosis* seguidos pelas células natural killer (NK) e macrófagos. As células NK podem destruir o patógeno diretamente ou matar monócitos infectados, além de induzir a ativação de células fagocitárias no sítio de infecção (RAJA, 2004; TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). O reconhecimento e a fagocitose do bacilo pelas células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) ocorrem através de receptores de complemento (CR1, CR2, CR3 e CR4) e receptores de manose (SCHLESINGER, 1996; SCHLUGER e ROM, 1998). Outros receptores de superfície de macrófagos e células dendríticas, como os receptores Toll-Like (TLRs) também estão envolvidos no reconhecimento de bactérias, assegurando, uma importante conexão entre as respostas imune inata e adquirida (NORTH e JUNG, 2004; KRUTZIK e MODLIN, 2004).

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). Em humanos, a notável suscetibilidade de pacientes com AIDS à tuberculose tem demonstrado o crítico papel dos linfócitos T CD4+ na imunidade protetora (ELLNER, 1997; MURRAY, 1999).

A ativação de linfócitos T CD4+ envolve o reconhecimento do antígeno-específico bacteriano apresentado na superfície de macrófagos infectados associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, além da interação de moléculas co-estimulatórias, tais como, interação entre CD80/CD86-CD28 (MURRAY, 1999; TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007). Os linfócitos T CD4 ativados secretam interferon gama (IFN- γ), e são chamados de Linfócitos T tipo 1 (Th1). Linfócitos Th1 secretando IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) podem ativar a capacidade bactericida e microbicida dos

macrófagos, via produção de NO. Os macrófagos ativados, principais células que produzem TNF- α , também secretam IL-12 e IL-18, citocinas envolvidas na resistência a infecção pelas micobactérias (MURRAY, 1999).

Várias citocinas estão envolvidas na resposta imunológica ao *M. tuberculosis*. A interleucina 12 (IL-12) induz ativação, diferenciação e produção de IFN- γ , bem como a expansão de células Th1 antígeno-específico (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, ABRAMO e MUNK, 2007). O TNF- α , por sua vez, parece estar envolvido em múltiplos papéis na imunopatogênese da tuberculose, sendo secretado por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. A secreção de TNF- α estimula a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e receptores de quimiocinas (RAJA, 2004). 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 da infecção ao *M. tuberculosis* (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 atua na regulação da resposta contra TB. 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 (VAHLENKAMP, TOMPKINS e TOMPKINS, 2004; CHEN et al., 2007) ou modulando a resposta imunológica na infecção, por regular a função de células T efetoras CD4+ e CD8+ (HORI, CARVALHO e DEMENGEOT, 2002). Mason et al. (2007) mostraram que camundongos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv produziram IL-10 e TGF- β por 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 produzidos por células T (RAJA, 2004).

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 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, os quais subseqüentemente liberam vesículas apoptóticas contendo antígenos micobacterianos. Estas vesículas são internalizadas por outras células, que processam o material antigênico para subseqüente apresentação, via MHC de classe I, aos Linfócitos T CD8+, processo conhecido como “crosspriming” ou sensibilização cruzada (WINAU et al., 2006).

Tem sido sugerido que 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, REMOLD e KORNFIELD, 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 mecanismo de ativação de linfócitos T CD8+ tem sido observado em um processo chamado de “crosspresentation” ou apresentação cruzada. Neste processo, antígenos fagocitados podem ter acesso ao citoplasma, sofrer degradação pelas proteases, conhecidas como proteossomos, retornar ao fagossomo através das proteínas transportadoras de antígenos (TAPs), onde se ligarão às moléculas de MHC de classe I e, subseqüentemente, serão apresentadas aos Linfócitos T CD8+ (GUERMONPREZ et al., 2003). Linfócitos T CD8+ ativados secretam IFN- γ , embora em menor quantidade em relação às células T CD4+. Além disso, células T CD8+ expressam granzimas, perforinas, o que os tornam capazes de lisar macrófagos infectados (BOOM et al., 2003).

As células que expressam TCR composto de cadeias polipeptídicas gamma/delta (células T $\gamma\delta$) reconhecem componentes fosforilados do *M. tuberculosis*

(BOOM, et al., 2003). Estas células também são capazes de produzir IFN- γ e lisar macrófagos infectados, ajudando a controlar o desenvolvimento da doença. (SCHLUGER e ROM, 1998; BOOM, et al., 2003). O subtipo menos comum de linfócitos é o das células T CD1 restritas. Estes linfócitos reconhecem glicolipídios de micobactérias e também estão envolvidos no controle da tuberculose (FLYNN, 1995; BOOM, et al., 2003).

1.4.3 Imunidade humoral frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

Para uma eficaz proteção contra a infecção pelo *Mycobacterium* 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 VALLIÈRE et al., 2005). Os anticorpos, por exemplo, podem aumentar a resposta imune por meio de alguns mecanismos, incluindo neutralização de toxinas, opsonização, ativação do sistema complemento e indução de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (DE VALLIÈRE et al., 2005). 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 potencialmente em contato com os anticorpos (TEITELBAUM et al., 1998).

Estudos sobre a resposta imune na TB têm demonstrado 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 células B (VORDERMEIER et al., 1996; JOHNSON et al., 1997). Porém, recentemente, esta controvérsia do papel dos linfócitos B e seus produtos na resposta imune da TB tem sido questionada por pesquisas que conseguiram observar progressão da infecção em camundongos deficientes em células B, indicando a importância destas células na imunidade do hospedeiro, no contexto de uma resposta imune eficaz na infecção pelo *M. tuberculosis* (BOSIO, GARDNER e ELKINS, 2000; DE VALLIÈRE et al., 2005). Outros estudos também confirmam a importância das células B e dos anticorpos no combate à TB. Tjärnlund et al. (2006) demonstraram que camundongos deficientes em receptores de Ig polimérica apresentaram maior susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*. Já, Roy et al. (2005) mostraram que o tratamento de camundongos infectados com *M. tuberculosis*

com imunoglobulina intravenosa (IVIG), resultou em uma reduzida carga bacteriana no baço e nos pulmões.

A importância dos anticorpos na TB também foi demonstrada pela utilização de anticorpos monoclonais (mAb_s) contra antígenos específicos de micobactéria. TEITELBAUM et al. (1998), demonstraram que mAb_s específicos contra o antígeno de superfície liporabinomanan (LAM) conferiram proteção a camundongos infectados com o *M. tuberculosis*. Interessante notar, 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 mAb_s, alguns estudos têm demonstrado 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 γ R1IB, apresentaram aumento do controle da infecção com elevada resposta Th1 nos pulmões, evidenciado por aumento na produção de IFN- γ por células T CD4+, e elevada expressão de MHC de classe II e moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2. De forma oposta, camundongos C57BL/6 apresentando remoção da cadeia γ do receptor Fc γ , mostraram grande susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*, com exarcebada imunopatologia, associado ao aumento da produção da citocina IL-10 (MAGLIONE et al., 2008; MAGLIONE e CHAN, 2009). Além disso, Maglione, Chu e Chan, (2007), observaram que camundongos deficientes em células B infectados com 100 CFU do *M. tuberculosis*, apresentaram exarcebada 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 γ 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 da TB. Entretanto, mais estudos poderiam revelar como estas células atuam de forma a otimizar a resposta imunológica contra o *M. tuberculosis*, e possivelmente tais pesquisas poderiam auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas e métodos de diagnóstico na TB.

1.5 Prevenção e controle

O Programa Nacional de Controle da Tuberculose tem como propósito reduzir a transmissão do bacilo da tuberculose na população através do diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos. As metas internacionais estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde e pactuadas pelo governo brasileiro são a descoberta de 70% dos casos e o tratamento de 85% dos mesmos (Ministério da Saúde, 2007). Além do diagnóstico e tratamento precoce também são medidas de controle da tuberculose o tratamento da infecção latente dos contatos e a vacinação (PEREIRA et al., 2007).

1.5.1 Vacinação

Em 1908, Camille Calmett e Albert Guérin iniciaram o desenvolvimento de uma vacina contra a tuberculose, utilizando uma linhagem do *Mycobacterium bovis* proveniente de uma vaca com mastite tuberculosa. Após 13 anos de passagens sucessivas em meio de cultura, realizada a cada três semanas, perfazendo um total de 231 passagens, os pesquisadores obtiveram uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis* original. A vacina produzida com *M. bovis* atenuado passou a ser utilizada em humanos, recebendo o nome de BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (STARKE, 1997).

O efeito protetor da primeira dose da vacina BCG contra as formas clínicas de meningite tuberculosa ou TB miliar é elevado. No entanto, os resultados são discordantes em relação à forma pulmonar, variando de ausência de efeito a níveis próximos de 80% (PEREIRA et al., 2007).

No Brasil, a vacina BCG é prioritariamente indicada para as crianças de 0 a 4 anos de idade, sendo obrigatória para menores de um ano, como dispõe a Portaria nº 452, de 6/12/76, do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2007). Apesar de

não ser a vacina ideal, o BCG tem um papel importante para o controle, principalmente em locais com alta incidência de tuberculose (PEREIRA et al., 2007).

Dentre as perspectivas futuras para o controle da TB está o desenvolvimento de novas vacinas. As principais estratégias podem envolver vacinas com micobactérias vivas atenuadas, que consistem de vacinas BCG geneticamente modificadas expressando antígenos protetores do *M. tuberculosis*, ou mutantes atenuados obtidos a partir de engenharia genética. Já outros estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas de subunidades (DNA, vetor viral recombinante ou proteínas recombinante), que são capazes de expressar um ou mais antígenos imunodominantes do *M. tuberculosis* relacionados com a indução de proteção (ANDERSEN et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007).

1.5.2 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 obtida em lâminas com escarro ou lavado broncoalveolar coradas em Ziehl-Nielsen ou pelo método de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (CFU), que levam em torno de 30 dias (HART, BEECHING, DUERDE, 1996).

Os principais medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose são a izoniazida, rifampicina e pirazinamida. Após duas semanas tomando os medicamentos não ocorre mais a transmissão. No entanto, apesar da simplicidade do tratamento, muitos doentes o abandonam, principalmente por já se sentirem melhor, o que leva ao desenvolvimento de cepas mais resistentes (Ministério da Saúde, 2000).

Hoje, linhagens de TB resistentes às principais drogas anti-TB tem emergido. TB-droga resistente refere-se a casos de tuberculose causados por uma linhagem isolada do *M. tuberculosis* que é resistente a pelo menos uma das drogas pertencentes à primeira linha de tratamento da tuberculose (SINGH, 2004). Chama-se de multi-drogas resistentes (MDR) primária quando o paciente nunca recebeu nenhum tratamento anterior de TB e já apresenta resistência. Normalmente foi contaminado por outro MDR. Na resistência secundária ou adquirida evidencia que os pacientes receberam no mínimo um tratamento anterior com mais de um mês de

duração. Normalmente é ocasionada pelo mal uso dos fármacos, administração irregular e principalmente pelo abandono do tratamento. O paciente normalmente apresenta baciloscopia positiva mesmo após o 4º mês de tratamento e pode apresentar os sinais e sintomas sugestivos de TB pulmonar ou extrapulmonar (Ministério da Saúde, 2007).

1.5.3 Diagnóstico

O diagnóstico precoce e o tratamento eficaz são as bases para a interrupção da cadeia de transmissão da tuberculose e o controle da doença em qualquer grupo social (HINRICHSEN, 2005).

O diagnóstico de certeza necessita do isolamento do *M. tuberculosis*, pois o quadro clínico é inespecífico. O sintoma mais comum é a tosse persistente, inicialmente seca e depois, às vezes, com eliminação de escarro mucóide e hemoptise por mais de quatro semanas. Sintomas sistêmicos são comuns, como febre (baixa e vespertina), suores noturnos e perda de peso. A suspeita de tuberculose deve ser sempre intensificada em pacientes com sintomas respiratórios, principalmente naqueles com alterações imunológicas, como desnutridos, alcoólatras e diabéticos (HINRICHSEN, 2005).

O diagnóstico da tuberculose deve ser feito através dos exames clínico, bacteriológico e radiológico, nenhum deles pode ser dispensado (PILHEU, 1998).

1.5.4 Exames bacteriológicos

Com suspeita clínica de tuberculose, deve-se coletar escarro, inicialmente três amostras, preferencialmente, pela manhã, em jejum, durante três dias consecutivos, antes da higiene oral. Este procedimento é importante para aumentar a positividade do método (SINGH, 2004). O escarro coletado deve ser corado pelo método de Ziehl-Neelsen para pesquisa direta de bacilos álcool-ácido-resistente (BAAR), que aparecerão como pequenos filamentos vermelhos à microscopia (HINRICHSEN, 2005). Muitos laboratórios têm utilizado auramina que permite a visualização do bacilo por fluorescência, e ao contrário da coloração por Ziehl-Neelsen, requer menos tempo para identificação do microrganismo (SINGH, 2004). A baciloscopia

direta é, portanto, o método diagnóstico de escolha, por seu fácil acesso, baixo custo e rapidez (HINRICHSEN, 2005).

Entre os métodos bacteriológicos, a cultura é considerada como método padrão ouro, no entanto apresenta desvantagens porque requer longo tempo para o crescimento do bacilo, 14-21 dias para gerar colônias visíveis (PILHEU, 1998; SALTINI, 2006). Por esta razão é indicada para os casos suspeitos de tuberculose pulmonar persistentemente negativos ao exame direto (baciloscopia) e para o diagnóstico de formas extrapulmonares como meningoencefálica, renal, pleural, óssea ou ganglionar. A cultura também está indicada nos casos de suspeita de resistência bacteriana às drogas, seguida de teste de sensibilidade (FUNASA, 2004).

1.5.5 Exame histopatológico

O exame histopatológico é o método empregado principalmente na investigação das formas extrapulmonares. A lesão apresenta-se como um granuloma, geralmente com necrose e infiltrado histiocitário de células multinucleadas. Como esta apresentação ocorre em outras doenças, o achado do bacilo do *M. tuberculosis* na lesão é fundamental para auxiliar o diagnóstico de tuberculose (FUNASA, 2004; Ministério da saúde, 2006).

1.5.6 Diagnóstico por imagem

O diagnóstico por imagem tem grande destaque no diagnóstico da tuberculose, sendo a radiografia do tórax o exame mais utilizado pela possibilidade de serem visualizadas as lesões comumente encontradas nos ápices pulmonares (HINRICHSEN, 2005).

A tomografia computadorizada pode ser de grande auxílio em alguns casos em que a radiografia do tórax apresenta resultados imprecisos, por alterações parenquimatosas mínimas ou por não permitir distinguir antigas lesões da tuberculose ativa. No entanto, é um método de maior custo e menor oferta, restrito aos centros de referência (Ministério da Saúde, 2007).

O exame radiológico é auxiliar no diagnóstico da tuberculose, sendo largamente utilizado nos casos suspeitos. Nesses pacientes, o exame radiológico permite a seleção de portadores de imagens sugestivas de tuberculose ou de outra

patologia, sendo indispensável submetê-los a exames bacteriológicos para se fazer um diagnóstico preciso, já que não é aceitável, exceto em crianças, o diagnóstico de tuberculose pulmonar sem investigação do agente causal pela baciloscopia de escarro (FUNASA, 2004). A radiologia também fornece informações essenciais para a conduta e acompanhamento destes pacientes e é extremamente importante para o monitoramento de possíveis complicações (ANDREU et al., 2004)

1.5.7 Diagnóstico imunológico

O teste cutâneo com o derivado protéico purificado do *M. tuberculosis* (“purified protein derivative – PPD) é indicado como método auxiliar no diagnóstico da tuberculose. Em caso de teste positivo isoladamente, indica apenas infecção e não é suficiente para confirmar o diagnóstico da tuberculose (FUNASA, 2004).

O derivado protéico PPD RT23 é utilizado tanto no Brasil quanto na Europa, aplicado por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1 ml, equivalente a 2UT (unidades de tuberculina). A técnica de aplicação e o material utilizado são padronizados pela Organização Mundial de Saúde (Guia de vigilância epidemiológica, 2004; CASCANTE et al., 2007).

A leitura do teste é realizada 72 a 96 horas após a aplicação, medindo-se, com régua milimetrada, o maior diâmetro transverso da área de endurecimento palpável. O resultado, registrado em milímetros, classifica-se como:

- 0mm a 4mm → não reator – indivíduo não infectado pelo *M. tuberculosis* ou com hipersensibilidade reduzida.
- 5mm a 9mm → reator fraco – indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias.
- 10mm ou mais → reator forte - indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis*, que pode estar doente ou não, e indivíduos vacinados com BCG nos últimos dois anos.

O principal inconveniente do teste cutâneo é a utilização de proteínas que não são específicas do *M. tuberculosis*, mas compartilhadas com as micobactérias do ambiente, o que diminuí muito a especificidade da prova (CASCANTE et al., 2007). Outras circunstâncias podem interferir nos resultados dos testes, como por exemplo: indivíduos vacinados com BCG; uso de fármacos (corticóides e outros

imunossupressores); portadores de doenças imunodepressoras (AIDS, sarcoidoses e outras neoplasias) (FUNASA, 2004; CASCANTE et al., 2007).

Nos últimos anos têm sido investigados novos métodos de diagnóstico baseados na quantificação “in vitro” da resposta imune celular. Estes métodos denominados genericamente de IGRA (interferon- γ release assay), ensaios de detecção de IFN- γ , detectam a liberação de IFN- γ por linfócitos T em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis* (CASCANTE et al., 2007). Existem três testes disponíveis comercialmente: T-SPOT.TB (TS-TB), QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) e QuantiFERON-TB Gold “in tube” QFT-GIT (BOCCHINO et al., 2008). A vantagem dos testes imunológicos está na capacidade de demonstrar se o paciente já foi sensibilizado pelo antígeno e confirmar infecção sem a necessidade de detectar o agente etiológico em alguma amostra biológica do paciente. Um teste *in vitro*, utilizando pequena amostra de células do paciente pode ser suficiente para a realização de uma rápida investigação imunológica (TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007).

Outro método imunológico comumente estudado para o diagnóstico da tuberculose é baseado na detecção de anticorpos no soro contra antígenos do *Mycobacterium*, dos quais podem ser proteínas, lipídios ou polissacarídeos (PALMA-NICOLÁS e BOCANEGRA-GARCÍA, 2007). Análises baseadas na detecção de anticorpos contra o *Mycobacterium* são alternativas importantes para o tradicional método de diagnóstico da tuberculose ativa uma vez que se detecta resposta imune durante a infecção. Além disso, o tipo de imunoglobulina detectado, IgG ou IgM, pode indicar se o processo está progredindo ou não. Métodos sorológicos também são vantajosos por serem de fácil aplicação e por apresentarem baixo custo. No entanto, estes métodos são bastante limitados para o diagnóstico da tuberculose devido a sua baixa especificidade e sensibilidade aos antígenos do *Mycobacterium* (PALMAS-NICOLÁS e BOCANEGRA-GARCIA, 2007; TEIXEIRA, ABRAMO e MUNK, 2007).

A maioria dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) desenvolvidos para detecção de anticorpos utilizam antígenos bem definidos, os quais apresentam múltiplos epítomos, alguns dos quais são específicos do *M. tuberculosis* (VERMA e JAIN, 2007), como por exemplo, proteínas codificadas dentro da região de diferença 1 (RD1), uma região cromossômica conservada em cepas virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (MAHARIAS et al., 1996; GOLETTI et al., 2006), que está ausente no

genoma de todos os tipos de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) e em muitas micobactérias que não causam tuberculose (ABEBE et al., 2007; GREENAWAY, 2005). O reconhecimento destas proteínas por células do sistema imunológico durante a TB, bem como a ausência dessas proteínas no genoma do BCG e muitas micobactérias do ambiente (MAHARIAS et al., 1996; GOLETTI et al., 2006), têm estimulado um grande interesse no potencial desses antígenos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.

1.6 Antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*

ESAT-6 e CFP-10 proteínas imunodominantes secretadas nos estágios iniciais de infecção, têm-se mostrado como bons marcadores da infecção por *M. tuberculosis* (POLLOCK e ANDERSEN, 1997; AREND et al., 2000; ABRAMO et al., 2006). Respostas às proteínas ESAT-6 e CFP-10 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; SPENSER 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 (PINXTEREN et al., 2000; KANUNFRE et al., 2008; SOYSAL et al., 2008). Por outro lado, recente estudo mostrou que ESAT-6 em alta concentração pode inibir a produção de IFN- γ em culturas de células T, podendo, portanto, atuar como importante fator de virulência na patogênese da TB (WANG et al., 2009).

ESAT-6 e CFP-10, são codificados pela região de diferença 1 (RD1), uma região cromossômica presente na maioria das espécies virulentas de micobactérias (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. zulgai* e *M. flavescens*), e ausentes em todas as espécies de *M. bovis* BCG e em muitas micobactérias não patogênicas do ambiente (HARBOE et al., 1996; BERTHET et al., 1998). Por serem reconhecidos por células do sistema imunológico durante a infecção e por estarem ausentes em muitas micobactérias não patogênicas e nas linhagens de *M. bovis*

BCG, estes antígenos são muito utilizados na pesquisa de novas vacinas e novos métodos de diagnóstico (LAURENS et al., 2000).

O complexo 85 (Ag85) formado pelos antígenos de 30/32 KDa, tem sido foco de extensiva pesquisa nos últimos anos. O antígeno 85 contém três proteínas estruturalmente relacionadas: 85A (MPT44) de 32 kDa, 85B (MPT59) de 30 kDa e 85C (MPT45) de 32,5 kDa (LIM et al., 1999; NAGAI et al., 1991), que constituem uma família de proteínas codificadas pelos genes *fbpA*, *fbpB* e *fbpC* respectivamente (ARMITINGE et al., 2000). Tem sido mostrado que estas proteínas possuem atividade micolil-transferase e provavelmente desenvolvem algum papel na síntese da parede celular (ARMITINGE et al., 2000).

Dentre as frações do complexo 85 (Ag85), diversos estudos têm mostrado que o antígeno 85B induz a proliferação e a liberação de altos níveis de IFN- γ em cultura de linfócitos T de camundongos imunizados (ANDERSEN et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2006). Além disso, camundongos imunizados com plasmídios que codificam componentes do complexo 85, mostraram que a vacinação com DNA-Ag85B induz uma forte resposta humoral com elevados níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-85B e uma forte resposta celular frente ao Ag85B recombinante, caracterizada por elevados níveis de citocinas tipo Th1 e baixos níveis Th2, conferindo proteção à subsequente infecção com micobactérias vivas (TEIXEIRA et al., 2006).

A proteína 16KDa pertence à superfamília alpha cristalina de pequenas proteínas de choque térmico foi isolada da fração citosólica e apresenta massa molecular de 16kD (RAJA et al., 2002). Tem sido referida de forma variada como: α cristalina (*acr*, Rv2031c), Hsp α e antígeno de 16kDa (YUAN, CRANE e BARRY, 1996). O gene que codifica esta proteína é encontrado somente nas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e, anticorpos contra Hsp α não apresentam ligações cruzadas com micobactérias comuns do ambiente (MANCA et al., 1997). Este antígeno contém epítomos-específicos de células B para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (VERBON et al., 1992), como mostrado pela presença de anticorpos específicos para esta proteína em 70% de pacientes com TB pulmonar escarro-positivos e 50% escarro-negativos, e ainda foi detectada a presença desses anticorpos em indivíduos com TB latente (RAJA et al., 2002; DEMISSIE et al., 2006). Já com relação à imunidade por células T, tem sido relatado que células T CD4⁺ e

CD8⁺ de pacientes com TB reconhecem epítomos da proteína 16kDa (CACCAMO et al., 2002; CACCAMO et al., 2003).

O antígeno de 16kDa não é detectável durante o crescimento exponencial do *M. tuberculosis*, mas, produzido em maior quantidade durante a fase estacionária (YUAN, CRANE e BARRY, 1996). Nesta fase, as micobactérias estão presentes em baixo número. O microambiente onde elas sobrevivem é bastante hostil, apresentando acesso restrito aos nutrientes e oxigênio, baixo pH e elevados níveis de enzimas hidrolíticas, radicais de nitrogênios reativos e radicais de oxigênio reativos liberados pelo sistema imune do hospedeiro (DEMISSIE et al., 2006). A importância desta proteína durante a fase latente foi demonstrada pela reduzida capacidade de crescimento de micobactérias deficientes para o gene que codifica a proteína 16kDa em macrófagos (YUAN et al., 1998).

HBHA (Heparin binding hemagglutinin adhesin) é uma proteína associada à superfície do *Mycobacterium tuberculosis* que está envolvida na aderência da bactéria às células epiteliais (MENOZZI et al., 1996). Esta proteína é produzida por todos os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo o BCG (MENOZZI et al., 1996).

A proteína HBHA sofre um processo de metilação envolvendo resíduos de lisina presentes no domínio C-terminal. Esse domínio metilado contendo muitas repetições ricas em lisina são funcionalmente importantes para interação da micobactéria com receptores contendo heparina-sulfato na superfície de células epiteliais (PETHE et al., 2001). Além disso, o processo de metilação da proteína HBHA também é importante para indução de imunidade protetora ao *M. tuberculosis*. Fato comprovado pela proteção não observada quando camundongos BALB/c foram imunizados subcutaneamente com a proteína HBHA recombinante produzida pela *E. coli*, que não apresenta os domínios metilados encontrados na proteína nativa do HBHA (TEMMERMAN et al., 2004).

Estudo recente demonstrou que a ruptura do gene *hbha* que codifica a proteína HBHA no *M. tuberculosis* ou *M. bovis* BCG afeta a interação da bactéria com as células epiteliais, mas não com células fagocitárias, indicando a importância desta proteína para a disseminação extrapulmonar do *Mycobacterium tuberculosis* (PHETE et al., 2001; PHETE et al., 2002). Também foi demonstrado que a disseminação do bacilo é limitada quando micobactérias tipo selvagem (MT103) são incubadas com anticorpos anti-HBHA por duas horas antes da infecção intranasal

em camundongos C57BL/6. Sendo portado, sugerido que resposta por anticorpos à proteína HBHA pode ajudar na proteção imunológica contra o *M. tuberculosis* (PHETE et al., 2001).

Estudos sobre a resposta imunológica na tuberculose se inserem em pesquisas cujas estratégias envolvem mecanismos celulares compreendendo, principalmente, o padrão de resposta imunológica Th1, que é essencial para o controle da infecção. No entanto, apesar de pouco pesquisado, o pequeno número de publicações sobre a resposta humoral na TB apresenta indícios de que a ausência de células B e seus produtos em camundongos infectados com *M. tuberculosis* aumentam a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (BOSIO, GARDNER e ELKINS, 2000; DE VALLIÈRE et al., 2005). Essa perspectiva de uma possível atuação da resposta humoral na TB foi o motivo pelo qual nos levou a realizar uma avaliação mais detalhada da resposta humoral de pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* em uma região endêmica para TB como Juiz de Fora – MG, através da detecção de anticorpos contra novos antígenos específicos do *M. tuberculosis*, que apresetam grande potencial para o diagnóstico da TB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta humoral, quantificando níveis séricos de IgG total, IgG1, IgG2 e IgG4 frente aos antígenos do *M. tuberculosis* em pacientes apresentando tuberculose pulmonar em diferentes tempos de tratamento, pacientes com tuberculose extrapulmonar e indivíduos saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar através do método ELISA os níveis de IgG total dos pacientes com tuberculose frente aos antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16K e HBHA do *M. tuberculosis*, de acordo com a forma clínica e tempo de tratamento.
- Estabelecer a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes pela análise da curva ROC (receiver operator characteristic curve).
- Quantificar através do método ELISA os níveis de IgG1, IgG2 e IgG4 dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa frente aos antígenos ESAT-6 e CFP-10 do *M. tuberculosis*, de acordo com o tempo de tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características demográficas da população estudada

Soros de 129 pacientes com tuberculose foram selecionados no Setor de Pneumologia da Policlínica Central de Saúde Pública de Juiz de Fora (MG). Inicialmente os soros foram divididos em duas categorias de acordo com a forma clínica da doença (102 pacientes com TB pulmonar e 27 pacientes com TB extrapulmonar) e, posteriormente, em três categorias de acordo com o estágio de tratamento dos pacientes com tuberculose pulmonar: I - pacientes com tuberculose ativa, 33 pacientes sem tratamento prévio ou com até 15 dias de tratamento, que ainda mantém baciloscopia positiva; II - pacientes no primeiro trimestre de tratamento, 47 pacientes com 1 a 3 meses de quimioterapia; III - pacientes tratados, 22 pacientes com 6 meses de quimioterapia. As características da população estudada revelaram que a maioria dos pacientes era do sexo masculino (62%) e apresentavam cicatriz vacinal (73%). A idade dos pacientes variou entre 13 a 79 anos, havendo média de idade de 35 anos (Tabela 1).

Foram incluídos no estudo apenas os pacientes com diagnóstico da doença confirmado por baciloscopia ou cultura, além do exame clínico e da realização do exame radiológico, como preconizado pelo Ministério da Saúde. Foram critérios de exclusão: AIDS, diabetes, hepatite, hipertensão, gravidez e alcoolismo. Trinta e oito estudantes e funcionários da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), vacinados com BCG, sem história de contato prévio com a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, e cinco estudantes estrangeiros, não vacinados com BCG, e de área não endêmica para tuberculose, foram incluídos no estudo como grupo controle.

Todos os indivíduos selecionados foram informados a respeito da importância e propósito de sua colaboração e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme consta no parecer aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (nº 256/2008).

Tabela 1- Características demográficas dos pacientes com tuberculose.

	TB Pulmonar (n=102) ^a			TB extra-pulmonar ^b (n=27)	TB total (n = 129)
	0M (n=33)	1-3M (n=47)	6M (n=22)		
Idade					
(Média ± SD)	40,3 ± 16,6	31,3 ± 10,4	35,2 ± 17,3	36,6 ± 12,1	34,5 ± 14,6
(Variação)	13 - 79	13 - 54	13 - 75	15 - 62	13 - 79
Gênero					
Masculino (%)	63	66	57	48	62
Feminino (%)	37	34	43	52	38
Cavidade^c					
Com (%)	33	29	35	0	31
NA (%)	59	69	57	0	66
Sem (%)	08	02	07	0	06
BCG^d					
Sim (%)	67	75	93	74	73
NA (%)	12	14	0	0	09
Não (%)	21	11	07	26	18

a – 102 pacientes com tuberculose pulmonar, sendo 33 pacientes na fase ativa de infecção (0M), 47 que receberam 1 a 3 meses de tratamento (1-3M) e 22 que completaram 6 meses de quimioterapia (6M).

b – 27 pacientes com tuberculose extrapulmonar.

c – Pacientes com TB que apresentaram lesão cavitária nos pulmões no exame de Raio X.

d – Paciente que apresentaram cicatriz vacinal (BCG).

NA – Não avaliado.

3.2 Antígenos estudados

Os antígenos utilizados neste estudo foram as proteínas recombinantes: ESAT-6 (early secreted antigenic target-6), CFP-10 (culture filtrate antigen-10), Ag85B (proteína de filtrado de cultura de 30kDa), 16kDa (HspX ou alfa-cristalina) e HBHA (heparin binding hemagglutinin adhesin). Todos sintetizados e purificados pela Leiden University Medical Center, Holanda e doados pelo professor Dr. Tom H. M. Ottenhoff, colaborador deste trabalho. Todos os antígenos foram testados na concentração de 2 µg/ml.

3.3 Coleta de sangue e obtenção de amostras de soro

Para coleta de sangue e obtenção do soro de pacientes e controles foram utilizados tubos de vacutainer sem heparina. Os tubos com o sangue coletados foram deixados a temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, após a

coagulação sanguínea, os soros foram coletados e congelados em freezer -20°C até o uso.

3.4 Padronização dos testes

Soro de 15 pacientes com TB ativa, sem tratamento prévio; 15 indivíduos controle sadio de área endêmica, estudantes e funcionários da Universidade Federal de Juiz de Fora; 05 indivíduos controle sadio de área não endêmica, estudantes estrangeiros, foram utilizados nas seguintes diluições: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640. Esses soros foram testados quanto à presença de anticorpos IgG específicos para o antígeno ESAT-6, com o objetivo de estabelecer a melhor diluição do soro para a detecção de anticorpos em pacientes com TB e indivíduos controle sadio. Posteriormente, foi realizado a padronização do ELISA relacionado a etapa do bloqueio das placas, para verificar qual bloqueio apresentaria menor ocorrência de reações inespecíficas. Para isto, foi utilizado soro de 05 pacientes com TB ativa e 05 indivíduos controle sadio de área endêmica na diluição 1/20. Tais soros foram testados quanto a presença de anticorpos IgG específicos para o antígeno ESAT-6 quando utilizando como bloqueio o soro de cabra ou a albumina sérica bovino (BSA).

3.5 Ensaio imunoenzimático

Amostras de soro foram analisadas pelo teste ELISA indireto de acordo com Souza et al. (2005), com modificações. Assim, placas de poliestireno, de 96 poços foram sensibilizadas com 2µg/ml (100µl/poço) de antígeno do *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA 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 placas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente com solução bloqueio PBS-T contendo 10% de soro de cabra. 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 novamente lavadas e o conjugado, anticorpo policlonal anti-IgG (1/3000) e anti-IgM (1/2000) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), anti-IgG1

(1/1000), anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 (1/2000) (Southern Biotechnology Associates, INC) ligado à peroxidase foi adicionado (100µl/poço) e posteriormente as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas novamente, sendo adicionado o substrato (tampão citrato de sódio/ácido cítrico, pH 5,5 contendo peróxido de hidrogênio e orto-fenilenodiamina (OPD), (100µl/poço). Após o desenvolvimento da cor por 10 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura efetuada em leitor de ELISA spectramax-190 (Molecular Davices, Surmyvale, CA, USA) 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.

3.6 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 curva foram obtidas utilizando-se programa estatístico MedCalc Statistical - versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html). O grupo de pacientes escolhido 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.

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 (MINEO *et al.*, 2005; MEDRONHO *et al.*, 2003).

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

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

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 pelo 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 não doentes, e a razão de verossimilhança negativo (RV-) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes (MEDRONHO *et al.*, 2003).

3.7 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, como apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do ELISA

Para avaliação da resposta humoral na tuberculose, primeiramente, foi realizado a padronização da diluição do soro e padronização do bloqueio para a detecção de níveis de anticorpos IgG contra os antígenos do *M. tuberculosis* em pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar.

O resultado apresentado mostra que nas diluições 1/20 e 1/40 (Figura 1- A e B) pacientes com tuberculose ativa apresentaram níveis significativamente mais altos de anticorpos IgG anti-ESAT-6 que os grupos controle sadio de área endêmica ($p < 0,05$) e controle sadio de área não endêmica ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Nota-se que a melhor diferenciação entre os grupos foi obtida quando se utilizou a diluição dos soros a 1/20. Assim, esta diluição foi utilizada nos experimentos seguintes para a detecção de anticorpos específicos aos antígenos do *M. tuberculosis* no soro de pacientes TB.

Com relação à padronização do ELISA relacionado a etapa do bloqueio das placas, não observamos diferença significativa entre o bloqueio com soro de cabra e o bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) (dados não mostrados). O bloqueio com BSA é usado na maioria dos ensaios imunoenzimáticos realizados em pesquisas de anticorpos de pacientes com tuberculose (HUSSAIN et al., 1995; ARAUJO et al., 2004; BECK et al., 2005; WANG et al., 2005). Optamos em utilizar em todos os experimentos o bloqueio com salina tamponada com fosfato (PBS a 0,15M, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e 10% de soro de cabra, por ser um material de fácil obtenção e de baixo custo em relação ao BSA.

Não foi detectado diferença nos níveis de anticorpos anti-ESAT-6 entre indivíduos controle de área endêmica e não endêmica (estrangeiros) (Figura 1- A e B). Sendo assim, nos experimentos seguintes utilizamos apenas o grupo controle de área endêmica (CT).

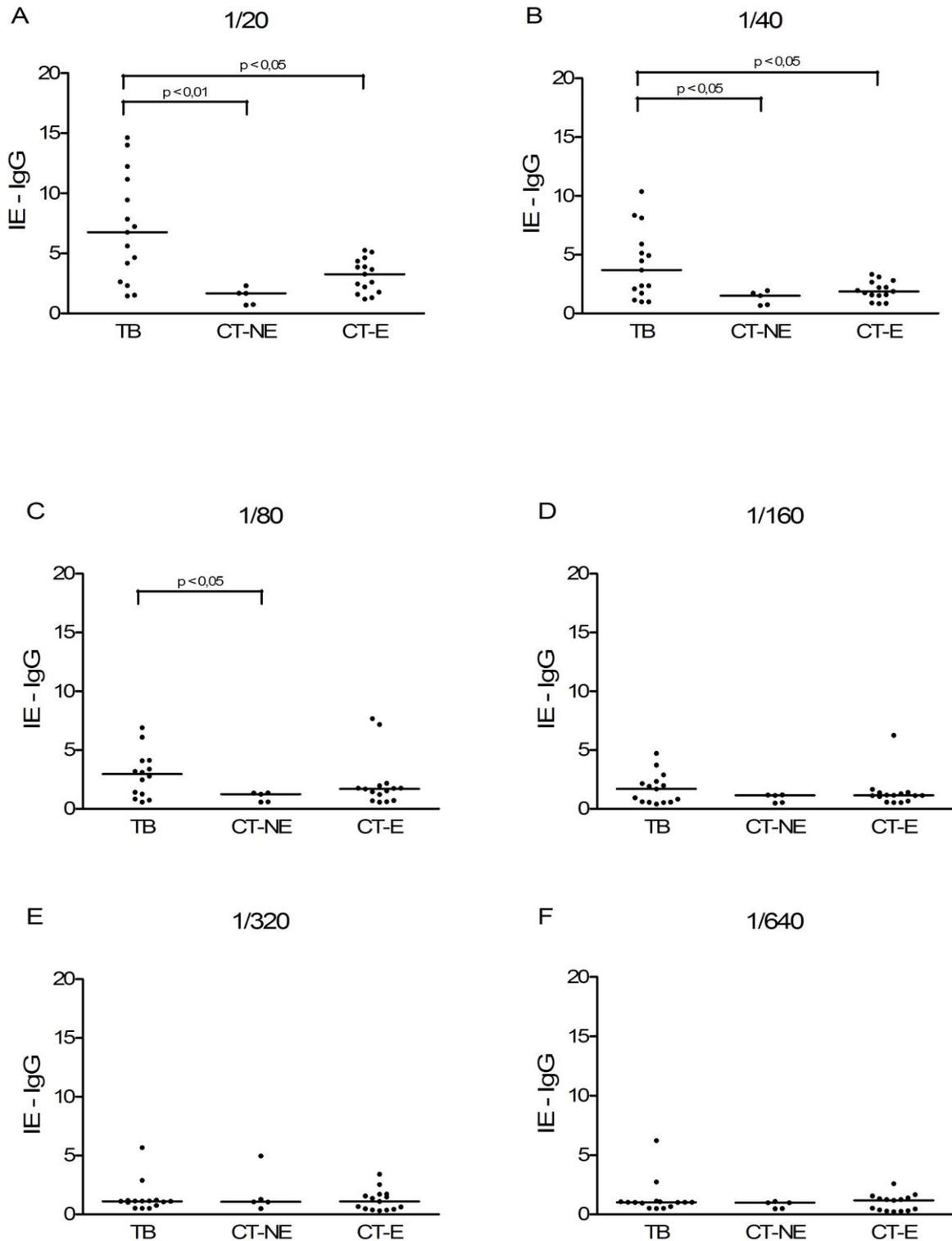


Figura 1- Titulação de anticorpos IgG anti-ESAT-6 em diferentes diluições de soro de pacientes com tuberculose pulmonar. Soros de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB; n=15), soros de indivíduos controle de área não endêmica (CT-NE; n=5) e soros de indivíduos controle de área endêmica (CT-E; n=15) foram diluídos a 1/20 (A), 1/40 (B), 1/80 (C), 1/160 (D), 1/320 (E) e 1/640 (F) para detecção de anticorpos IgG anti-ESAT-6, através do ELISA. A barra horizontal representa a mediana. (IE) Índice ELISA.

4.2 Avaliação sorológica de acordo com a forma clínica da doença

Inicialmente avaliamos a resposta humoral de acordo com a forma clínica dos pacientes com TB. Amostras de soro de pacientes com TB pulmonar (n=102), TB extrapulmonar (n=27) e controles sadios (n=38) foram analisados para verificar a presença de anticorpos IgG específicos contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, Ag 85B, 16kDa e HBHA do *M. tuberculosis*.

Como mostram as figuras 2 e 3, a produção de anticorpos IgG foi similar nos grupos TB pulmonar e TB extrapulmonar para os diferentes antígenos do *M. tuberculosis*. Níveis significativos de anticorpos contra os antígenos ESAT-6, CFP-10 (Fig. 2 A e B), Ag85B, 16kDa e HBHA (Fig. 3 A, B e C) do *M. tuberculosis* foram detectado nos grupos TB pulmonar e TB extrapulmonar comparados ao grupo controle sadio ($p < 0,05$). Estes resultados mostram que pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar apresentam elevada produção de anticorpos IgG contra vários antígenos do *M. tuberculosis*.

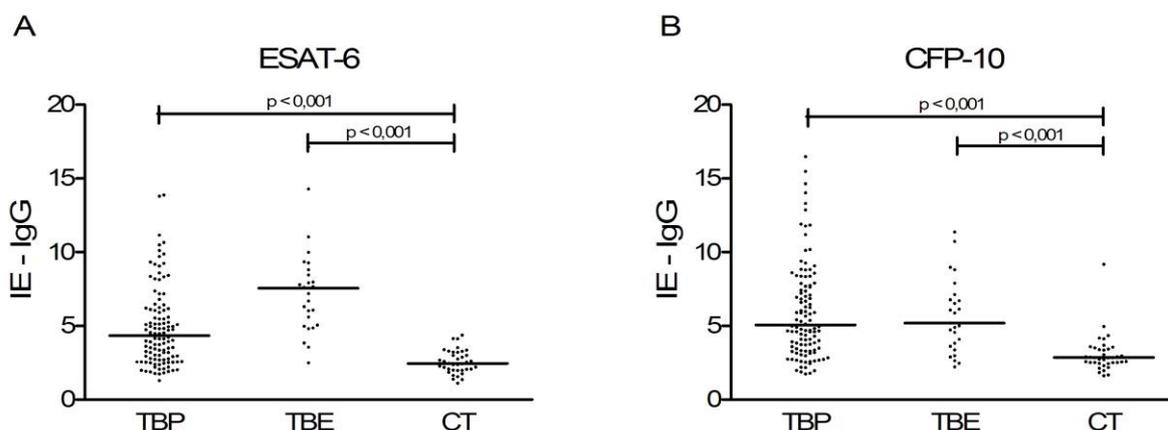


Figura 2- Detecção de anticorpos IgG contra ESAT-6 e CFP-10 em pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Níveis de anticorpos IgG específicos para os antígenos ESAT-6 (A) e CFP-10 (B) no soro de 102 pacientes com tuberculose pulmonar (TBP), em 27 pacientes com tuberculose extrapulmonar (TBE) e em 38 indivíduos controle sadios (CT), na diluição 1/20. A barra horizontal representa a mediana. (IE) Índice ELISA.

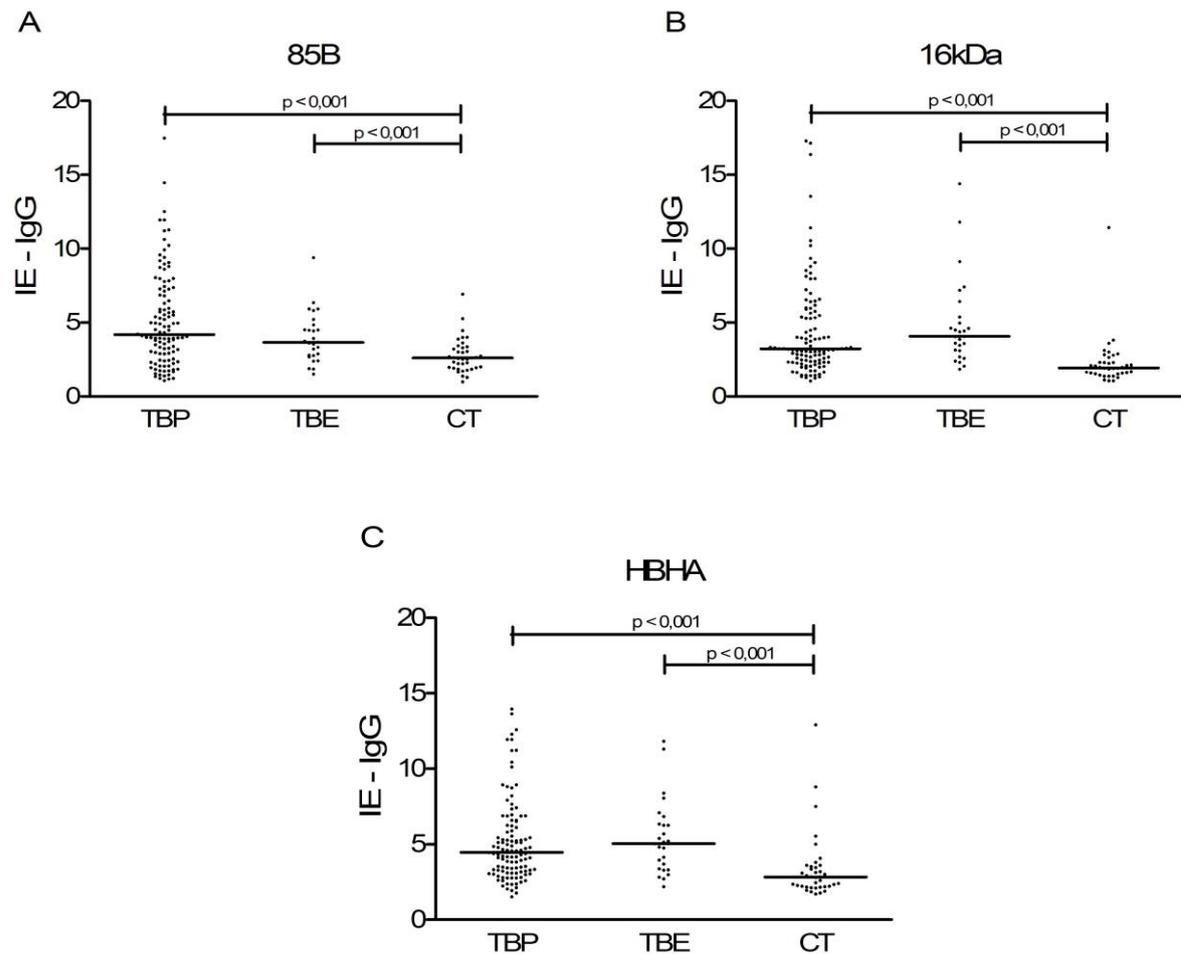


Figura 3- Detecção de anticorpos IgG contra 85B (A), 16kDa (B) e HBHA (C) em pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Níveis de anticorpos IgG específicos para os antígenos 85B (A), 16kDa (B) e HBHA (C) no soro de 102 pacientes com tuberculose pulmonar (TBP), em 27 pacientes com tuberculose extrapulmonar (TBE) e em 38 indivíduos controle sadios (CT), na diluição 1/20. A barra horizontal representa a mediana. (IE) Índice ELISA.

4.3 Avaliação sorológica de acordo com o tempo de quimioterapia

Para avaliar o efeito da quimioterapia na resposta humoral de pacientes com TB, utilizamos o grupo de pacientes com TB pulmonar (n=102) que apresentou um número maior de amostras que o grupo de pacientes com TB extrapulmonar (n=27). Sendo assim, níveis séricos de anticorpos IgG e IgM específicos para antígenos do *M. tuberculosis* foram estudados em pacientes com TB pulmonar com diferentes tempos de tratamento: I - pacientes com tuberculose ativa (n = 33); II - pacientes com 1 a 3 meses de quimioterapia (n = 47); III - pacientes tratados, que completaram 6 meses de quimioterapia (n = 22).

Amostras de soro dos pacientes estudados foram testados contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA. Como mostram as figuras 4 e 5, os níveis de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6, CFP-10 (Fig. 4 A e B), 85B e HBHA (Fig. 5 A e C) foram significativamente mais elevados no soro de pacientes com TB ativa quando comparado com o grupo controle sadio ($p < 0,001$). Além disso, pacientes com TB ativa apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgG em comparação com os pacientes tratados ($p < 0,001$). Resultados semelhantes foram obtidos no grupo de pacientes com 1-3 meses de tratamento, não havendo diferença significativa, neste grupo, em relação ao grupo de pacientes com TB ativa (Fig. 4 e 5).

Para o antígeno 16kDa, foi observado que pacientes com TB ativa apresentaram níveis de anticorpos IgG aumentados quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$), assim como em comparação com o grupo de pacientes TB que completaram o tratamento ($p < 0,05$). Diferente dos resultados observados para ESAT-6, CFP-10, 85B e HBHA pacientes com 1-3 meses de tratamento apresentaram níveis aumentados de anticorpos IgG-anti 16kDa quando comparados aos pacientes com TB ativa ($p < 0,01$) (Fig. 5B).

Além da detecção de anticorpos IgG contra antígenos específico do *M. tuberculosis*, também foi feita uma análise dos níveis séricos de IgM em pacientes com diferentes tempos de tratamento frente aos antígenos ESAT-6 e 16kDa. Os resultados obtidos mostraram baixos níveis de anticorpos IgM em comparação àqueles observados para IgG anti-ESAT-6 e anti-16kDa. Além disso, não foi observada diferença estatística dos grupos de pacientes em comparação com o grupo de indivíduos controle sadio. Devido à baixa resposta por anticorpos IgM para

os pacientes com TB ativa não foram realizados novos experimentos para avaliar a resposta por anticorpos IgM para os antígenos CFP-10, 85B e HBHA (Fig. 6).

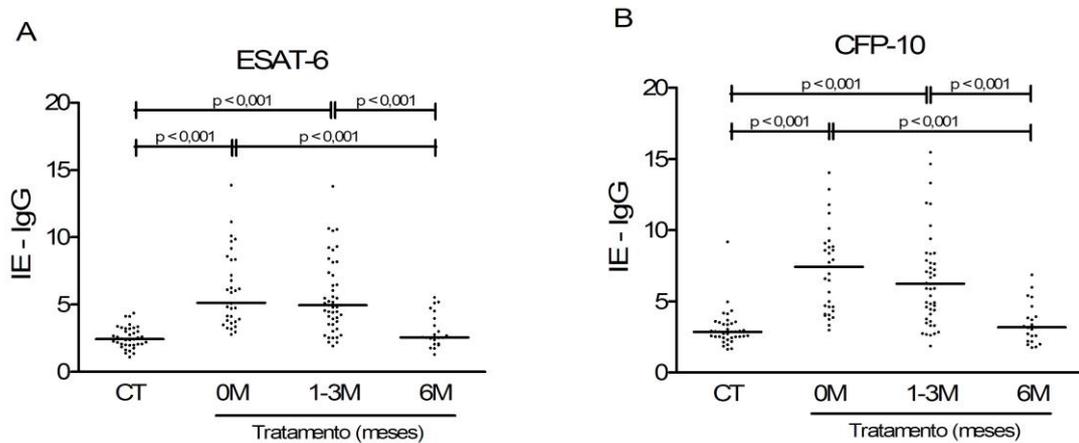


Figura 4- Detecção de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10 em grupos de pacientes com tuberculose pulmonar. Níveis de anticorpos IgG específicos para os antígenos ESAT-6 (A) e CFP-10 (B) no soro de pacientes com tuberculose ativa (n=33); pacientes com 1 a 3 meses de tratamento (n=47); pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (n=22) e em indivíduos controle sadios (n=38), na diluição 1/20. A barra horizontal representa a mediana. (IE) Índice ELISA.

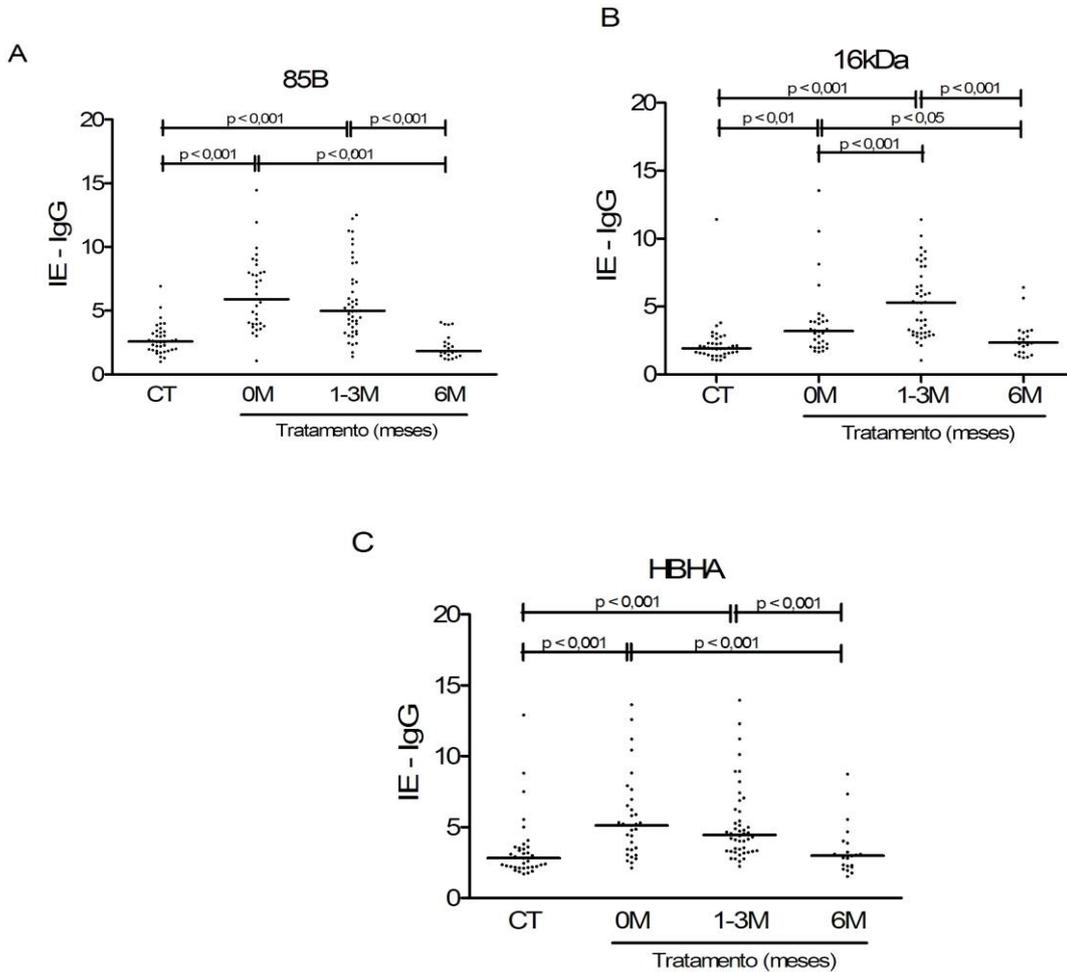


Figura 5- Detecção de anticorpos IgG contra os antígenos 85B, 16kDa e HBHA em grupos de pacientes com tuberculose pulmonar. Níveis de anticorpos IgG específicos para os antígenos 85B (A), 16kDa (B) e HBHA (C) no soro de pacientes com tuberculose ativa (n=33); pacientes com 1 a 3 meses de tratamento (n=47); pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (n=22) e em indivíduos controle sadios (n=38), na diluição 1/20. A barra horizontal representa a mediana. (IE) Índice ELISA.

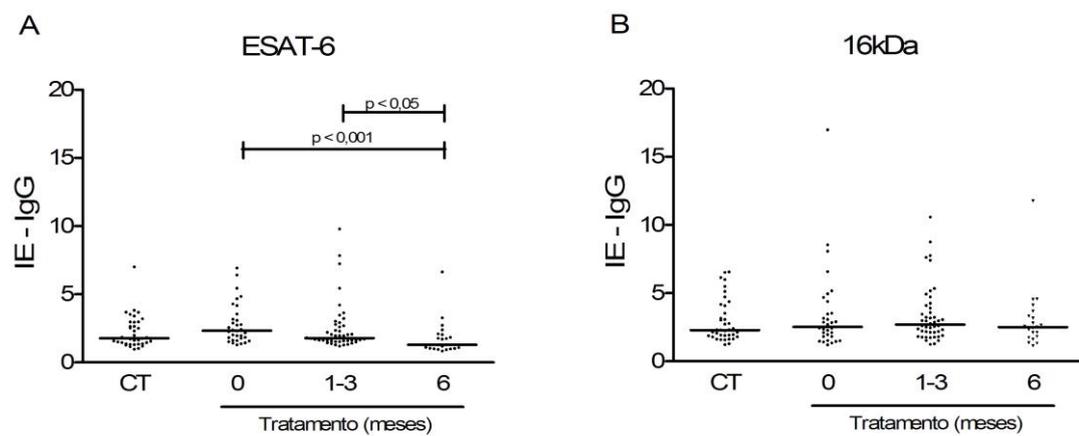


Figura 6- Detecção de anticorpos IgM contra os antígenos ESAT-6 e 16kDa em grupos de pacientes com tuberculose pulmonar. Níveis de anticorpos IgM específicos para os antígenos ESAT-6 (A) e 16kDa (B) no soro de pacientes com tuberculose ativa (n=33); pacientes com 1 a 3 meses de tratamento (n=47); pacientes que completaram 6 meses de quimioterapia (n=22) e em indivíduos controle sadios (n=38), na diluição 1/20. A barra horizontal representa a mediana. (IE) Índice ELISA.

4.4 Estudo das curvas ROC dos testes de ELISA para os antígenos ESAT-6, CFP-10, Ag85B, 16kDa e HBHA do *Mycobacterium tuberculosis*

Análise da curva ROC foi realizada para identificar alguns valores importantes na avaliação dos antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA e sua aplicabilidade no diagnóstico da tuberculose. Tais parâmetros incluem a acurácia do teste, representada pela área sob a curva ROC (ASC) e os valores de sensibilidade e especificidade, bem como as razões de verossimilhança positiva e negativa quando necessário. Os resultados da curva ROC mostraram que o valor da área sob a curva (ASC) dos antígenos ESAT-6 (ASC=0.946, IC 95%: 0,865 a 0,985), CFP-10 (ASC=0.942, IC 95%: 0,859 a 0,983) foram significativamente maiores que o valor da ASC do antígeno 16kDa (ASC=0.809, IC 95%: 0,699 a 0,893, $p<0,05$) e HBHA (ASC=0.805, IC 95%: 0,694 a 0,890, $p<0,05$) (Figura 7). Já o valor da ASC do antígeno 85B (ASC=0.909, IC 95%: 0,817 a 0,964) foi significativamente maior que o valor da ASC do antígeno HBHA ($p<0,05$), porém esta diferença não foi observada com relação o valor da ASC do antígeno 16kDa ($p > 0,05$) (Figura 8). Não houve diferença significativa entre as áreas dos antígenos ESAT-6, CFP-10 e 85B ($p>0,05$) (Figura 9). Estes dados mostram que os antígenos ESAT-6, CFP-10 apresentaram melhor acurácia que os antígenos 85B, 16kDa e HBHA.

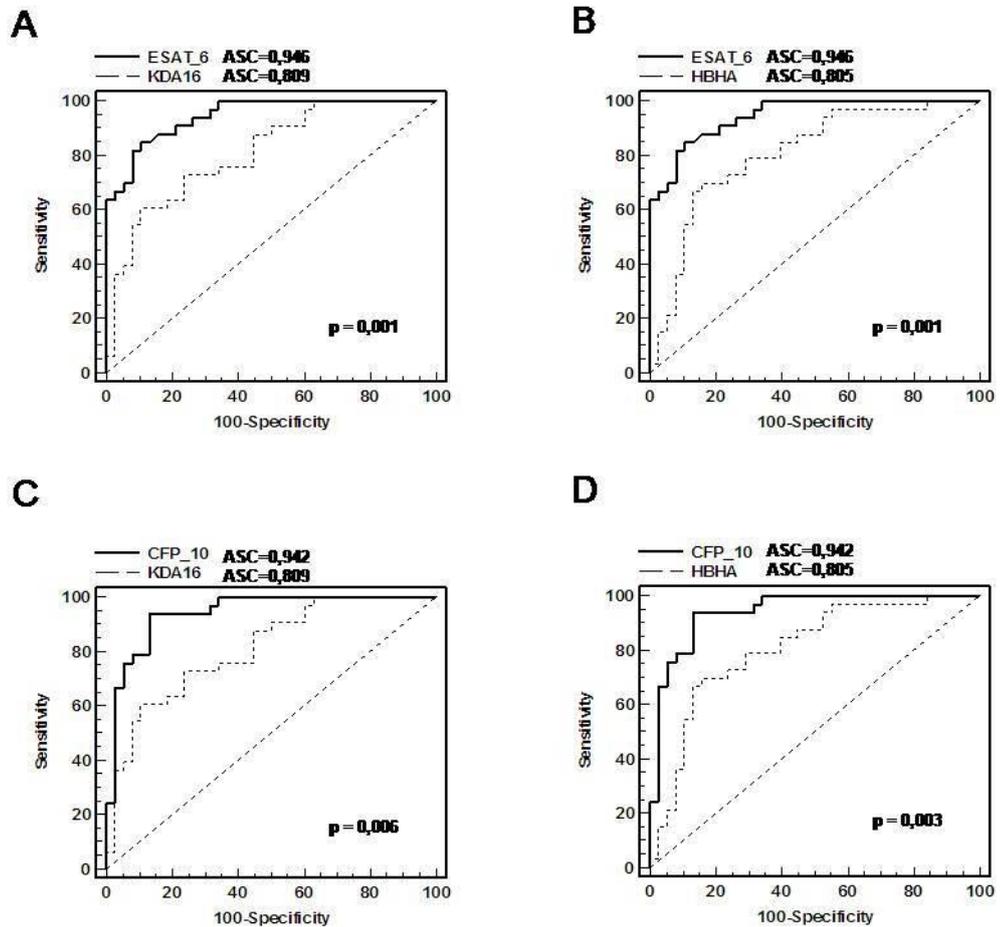


Figura 7– Comparação dos antígenos ESAT-6, CFP-10, 16kDa e HBHA, através da curva ROC (receiver operator characteristic). As curvas ROC foram realizadas para comparar o desempenho dos antígenos ESAT-6 versus 16kDa (A), ESAT-6 versus HBHA (B), CFP-10 versus 16kDa (C) e CFP-10 versus HBHA (D) no diagnóstico da TB.

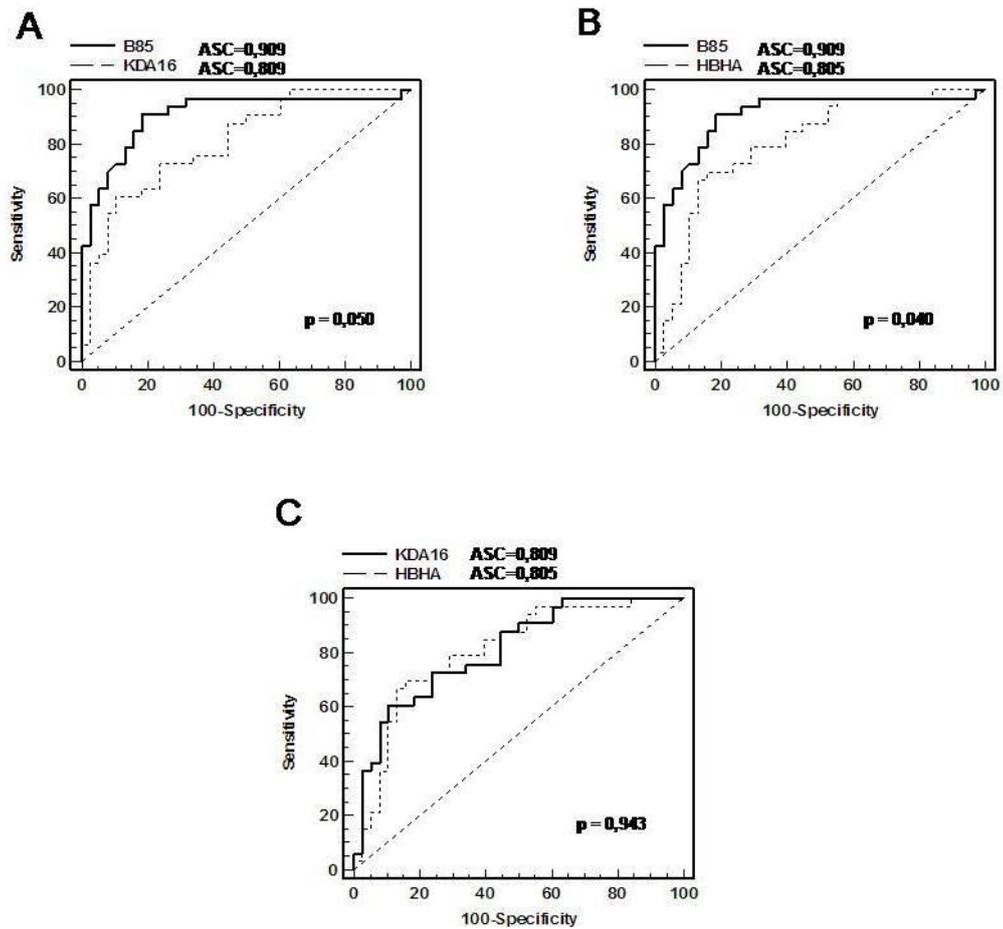


Figura 8– Comparação dos antígenos 85B, 16kDa e HBHA, através da curva ROC (receiver operator characteristic). As curvas ROC foram realizadas para comparar o desempenho dos antígenos 85B versus 16kDa (A), 85B versus HBHA (B) e 16kDa versus HBHA (C) no diagnóstico da TB.

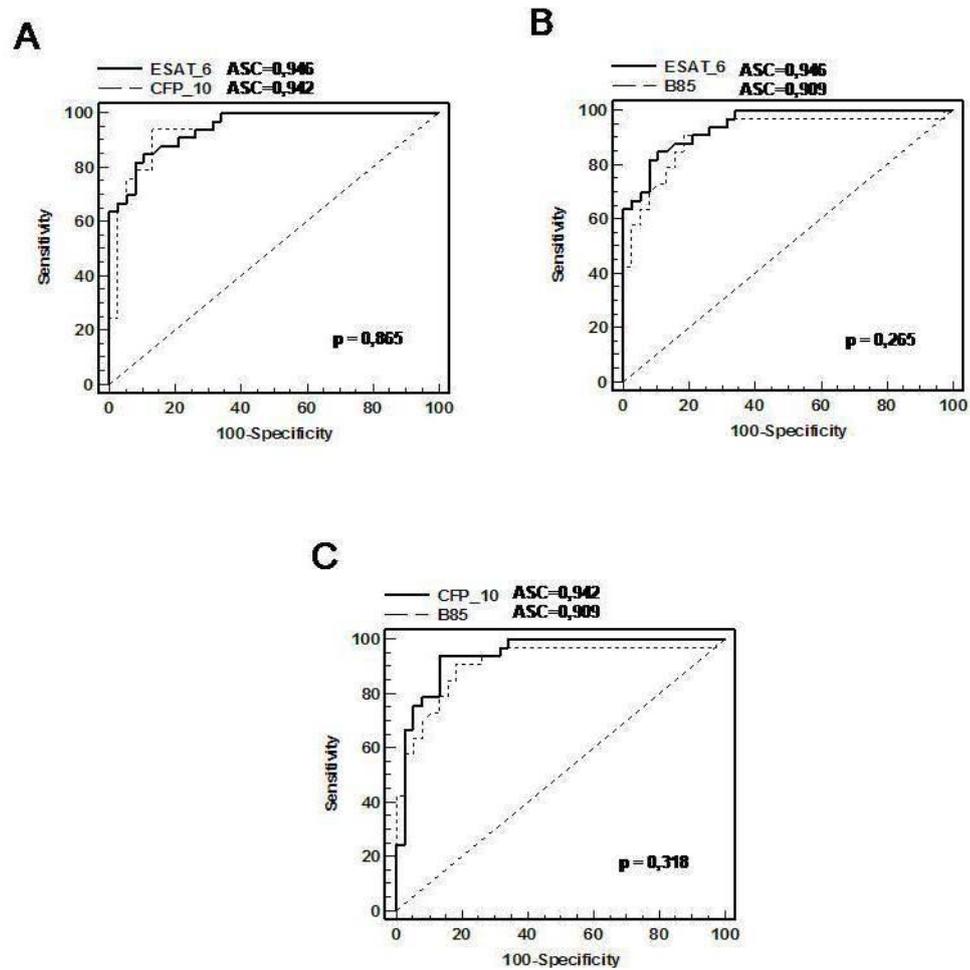


Figura 9– Comparação dos antígenos ESAT-6, CFP-10 e 85B, através da curva ROC (receiver operator characteristic). As curvas ROC foram realizadas para comparar o desempenho dos antígenos ESAT-6 versus CFP-10 (A), ESAT-6 versus Ag85B (B) e CFP-10 versus Ag85B (C) no diagnóstico da TB.

4.5 Sensibilidade e especificidade

A avaliação da sensibilidade e especificidade pela curva ROC mostrou que os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA apresentaram sensibilidade de 85%, 94%, 91%, 61% e 70%, respectivamente, e especificidade de 89%, 87%, 82%, 89% e 84%, 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 8,06, 7,14, 4,94, 5,76 e 4,41, respectivamente, para razão de verossimilhança positiva e 0,17, 0,07, 0,11, 0,44 e 0,36, respectivamente, para razão de verossimilhança negativa. Estes resultados confirmam o melhor desempenho dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 em comparação aos antígenos 85B, 16kDa e HBHA.

Tabela 2- Sensibilidade e especificidade dos antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA no sorodiagnóstico da tuberculose pulmonar.

	Cut off	Sensibilidade %	Especificidade %	RV +	RV -
ESAT-6	3,399	85	89	8,06	0,17
CFP-10	3,691	94	87	7,14	0,07
85B	3,429	91	82	4,94	0,11
16KDa	3,000	61	89	5,76	0,44
HBHA	3,802	70	84	4,41	0,36

O cut off, dados de sensibilidade e especificidade e valores de verossimilhança positivo (RV+) e Negativo (RV-) foram determinados pela análise das curvas ROC.

4.6 Avaliação das subclasses de IgG para os antígenos ESAT-6 e CFP-10

Tendo observado títulos elevados de anticorpos IgG anti-ESAT-6 e anti-CFP-10 no soro de pacientes com TB ativa, e por estes antígenos apresentarem melhor capacidade em discriminar pacientes com TB pulmonar ativa de indivíduos controle sadios, resolvemos investigar quais as subclasses de IgG estavam aumentadas. Os resultados mostram que níveis séricos de anticorpos IgG1 em pacientes com tuberculoses pulmonar ativa foram maiores que os níveis de IgG2 ($p < 0,001$ para ESAT-6 e $p < 0,05$ para CFP-10). Além disso, foi detectado menor produção de IgG4 frente aos antígenos testados em relação aos níveis observados para IgG1 e IgG2 ($p < 0,001$). A produção de IgG4 foi, entretanto, maior que a observada no soro de indivíduos controle somente para o antígeno ESAT-6 (Fig. 10). Além da detecção das subclasses IgG1, IgG2 e IgG4, também foi feita uma análise dos níveis séricos de IgG3 anti-ESAT-6 e anti-CFP-10 nos pacientes com TB ativa, porém, os resultados obtidos mostraram níveis muito baixos de IgG3 não sendo possível demonstrá-los.

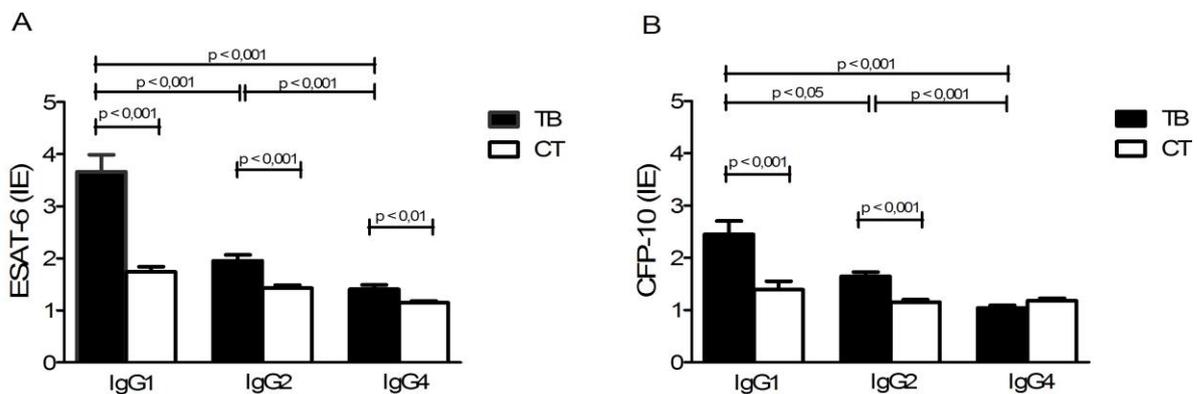


Figura 10- Detecção de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG4 contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10 em pacientes com tuberculose pulmonar ativa. Níveis de anticorpos IgG1, IgG2 and IgG4 específicos para os antígenos ESAT-6 (A) e CFP-10 (B) no soro de pacientes com tuberculose ativa (n=33) e em indivíduos controle sadios (n=38), na diluição 1/20. (IE) Índice ELISA.

5 DISCUSSÃO

A resposta imune adaptativa na tuberculose (TB) envolvendo a atividade específica de linfócitos T, do tipo Th1, é importante para o efetivo controle da infecção pelo *M. tuberculosis* (KAUFMANN, 1993; ELLNER, 1997; MURRAY, 1999). No entanto, estudos envolvendo a infecção de camundongos deficientes em células B conseguiram observar progressão da infecção, demonstrando que a resposta humoral pode auxiliar na composição de uma resposta imune eficaz ao bacilo (BOSIO, GARDNER e ELKINS 2000; VALLIÈRE, 2005; MAGLIONE, XU e CHAN, 2007). Além disso, outros trabalhos têm observado a produção de anticorpos contra muitas proteínas de micobactérias no soro de pacientes com TB (IMAZ et al., 2001; WANG et al., 2005). Neste contexto, observa-se a necessidade de mais estudos sobre o papel da imunidade humoral na infecção pelo *M.tuberculosis*. Tais conhecimentos poderiam ajudar e direcionar as pesquisas para o desenvolvimento de métodos mais eficientes no diagnóstico da tuberculose.

O principal mecanismo para diagnosticar a TB é a identificação do microrganismo em secreções ou tecidos de pacientes. Entretanto, o processo é muito difícil e apresenta algumas limitações. A sensibilidade do exame de escarro é baixa, especialmente em pacientes não cavitários, e o tempo necessário para o resultado de exames de cultura pode ser de 6 a 8 semanas. Além disso, os sintomas clínicos não são específicos e os achados radiográficos de tórax tem sido estimados como atípicos em mais de 30% dos pacientes (CHIANG et al., 1997).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas na tentativa de melhorar o diagnóstico da tuberculose. Uma das alternativas é o teste sorológico que se baseia na detecção de anticorpos contra antígenos específicos do *Mycobacterium*. Os métodos sorológicos são bastante atraentes pelas suas vantagens: fácil aplicação, baixo custo e não são invasivos. No entanto, apresentam limitações importantes, tais como baixa sensibilidade e especificidade aos antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* (PALMA-NICOLÁS e BOCANEGRA-GARCIA, 2007). Na tentativa de solucionar tais problemas, proteínas estruturais e proteínas que são secretadas ou excretadas, *in vitro*, pelo *M. tuberculosis*, bem como antígenos sintéticos ou recombinantes, têm sido extensivamente investigados (ANDERSEN et al.,1991; MORAN et al., 2001; BECK et al., 2005).

Avaliando a resposta humoral durante o curso da infecção com *M. tuberculosis*, neste trabalho foi possível observar que 1) pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar apresentaram altos níveis de anticorpos IgG comparados aos indivíduos controle BCG vacinados contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA do *M. tuberculosis*; 2) níveis de anticorpos IgG em resposta aos antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA apresentaram-se elevados na infecção ativa, antes da quimioterapia, e diminuíram após o tratamento; 3) análise da curva ROC mostrou que os antígenos ESAT-6 e CFP-10 apresentaram maior capacidade de discriminar indivíduos infectados com *M. tuberculosis* que o antígeno 85B, 16kDa e HBHA; 4) pacientes com TB ativa produziram altos níveis de anticorpos IgG1 anti-ESAT-6 e anti-CFP-10 em relação aos indivíduos controle sadio.

5.1 Níveis de anticorpos IgG se apresentaram aumentados nos pacientes com tuberculose pulmonar e tuberculose extrapulmonar

Numa abordagem inicial, com o objetivo de verificar se pacientes com tuberculose produzem anticorpos contra proteínas de micobactéria, realizamos avaliação da produção de anticorpos IgG contra vários antígenos específicos do *M. tuberculosis* em pacientes com TB pulmonar e TB extrapulmonar. Os resultados mostraram que pacientes com tuberculose, independente de sua forma clínica (TB pulmonar ou TB extrapulmonar), apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, Ag85B, 16kDa e HBHA do *Mycobacterium tuberculosis* quando comparados com indivíduos controle sadio BCG vacinados. Estes resultados mostraram estar de acordo com outros trabalhos que também detectaram níveis mais altos de IgG contra vários antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* no soro de pacientes com TB pulmonar e TB extrapulmonar (MAEKURA et al., 1993; KHOMENKO et al., 1996; ARAUJO et al., 2004; WANG et al., 2005; WELDINGH et al., 2005).

5.2 Níveis de anticorpos IgG contra antígenos do *M. Tuberculosis* apresentam-se elevados durante a infecção ativa e diminuem após o tratamento

Estudos têm mostrado que anticorpos no soro de pacientes com TB ativa são produzidos contra uma variedade de antígenos específicos do *M. tuberculosis* (LYASHCHENKO et al., 1998; IMAZ et al, 2001; WANG et al., 2005). Neste trabalho, pacientes com TB pulmonar ativa apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA comparados aos indivíduos controle sadios BCG vacinados. Diferente dos resultados observados para ESAT-6, CFP-10, 85B e HBHA, que não apresentaram alterações significativas no nível de IgG entre os grupos de pacientes TB pulmonar ativa e pacientes no início de tratamento, 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 que é um antígeno citosólico, portanto, o início da quimioterapia 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. Semelhante aos nossos resultados para o antígeno 16kDa, elevados níveis de anticorpos contra antígenos de filtrado de cultura do *M. tuberculosis* nos primeiros meses após o início do tratamento tem sido associados com intensa estimulação da resposta humoral por antígenos liberados após a morte da bactéria e/ou com o desaparecimento de antígenos micobacteriais circulantes de maneira que anticorpos específicos não sejam mais ligados em imunocomplexos (IMAZ e ZERBINI, 2000). Embora nossos resultados não tenham apresentado aumento nos títulos de IgG após o início da quimioterapia para os antígenos ESAT-6, CFP-10 e 85B, os mesmos permaneceram elevados, mostrando que o sistema imunológico dos pacientes com TB continuaram sendo estimulados, indicando a presença destas proteínas antes e após o início do tratamento. Coerentemente, não houve diferença nos níveis de anticorpos IgG no soro de pacientes com 1-3 meses de tratamento em relação aos pacientes com infecção ativa para o antígeno HBHA que é uma proteína associada à superfície do *Mycobacterium tuberculosis* (MENOZZI et al., 1996).

Como vimos, os títulos de anticorpos IgG em pacientes com TB ativa contra os antígenos testados do *M. tuberculosis* foram elevados. Após o tratamento, estes

títulos diminuíram significativamente, retornando a níveis similares aqueles observados para os indivíduos controle BCG vacinados. De acordo com os nossos resultados Drowart et al. (1991) observaram diminuição dos níveis de anticorpos específicos ao antígeno 85A em pacientes tratados, porém, os níveis de anticorpos contra antígenos de filtrado de cultura permaneceram no mesmo nível. Já Sireci et al. (2007) também observaram baixos níveis de anticorpos IgG específicos ao antígeno 16kDa em crianças com TB após a quimioterapia. Interessantemente, Almeida (2008) utilizando amostras de sangue dos mesmos pacientes com tuberculose estudados no presente trabalho, observou que após o tratamento quimioterápico contra a TB, as células do sangue periférico estimuladas com o antígeno ESAT-6/CFP-10 também mostraram diminuição nos níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 em relação aos níveis encontrados nos mesmos pacientes com TB ativa. Segundo Ribeiro-Rodrigues et al. (2002) as células obtidas no escarro de pacientes com TB após o tratamento antimicobacteriano, também apresentaram níveis reduzidos de IFN- γ e TNF- α e redução do número de bacilos, em comparação com os pacientes não tratados. Nicol et al. (2005) encontraram níveis aumentados de IFN- γ por ELISPOT em resposta ao PPD e ESAT-6 após um mês de tratamento em crianças com TB, e esses níveis diminuíram após três e seis meses de tratamento quimioterápico. Sugerimos que a presença de proteínas específicas do *M. tuberculosis*, como ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA, requer bacilos viáveis e metabolicamente ativos. Desta forma, células produtoras de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2, assim como células produtoras de anticorpos específicos para proteínas do *M. tuberculosis* poderiam estar presentes em alta frequência durante a fase de ativa replicação bacteriana, o que não aconteceria com os pacientes tratados.

5.3 Análise da curva ROC mostrou que os antígenos ESAT-6, CFP-10 apresentaram maior capacidade em discriminar indivíduos infectados com o *M. tuberculosis* que os antígenos 85B, 16kDa e HBHA

Análise da curva ROC mostrou sensibilidade de 85% e 94% para ESAT-6 e CFP-10, respectivamente, e especificidade de 89% e 87%. Contrário aos nossos resultados, Greenaway et al. (2005) ao avaliarem pacientes com TB ativa de Gambia, quanto a detecção de anticorpos IgG anti- ESAT-6 e anti-CFP-10,

obtiveram sensibilidade de 67% e 63%, respectivamente, e especificidade de 51% e 55%, respectivamente. Já Rosenkrands et al. (2008) ao analisarem a sensibilidade da proteína resultante da fusão de ESAT-6 e CFP-10 em paciente TB-HIV negativo, encontraram sensibilidade de 92%, utilizando como controle, indivíduos saudáveis de região não endêmica, e 42% utilizando como controle, indivíduos de região endêmica com outro tipo de doença respiratória. Esta variabilidade na sensibilidade e especificidade dos testes, provavelmente, pode estar relacionada ao nível de exposição da população ao patógeno. Devido às reinfecções sucessivas, muitos indivíduos de área endêmica para TB desenvolvem a infecção latente, levando à produção de anticorpos contra antígenos específicos do *M. tuberculosis*. Hoff et al. (2007) observaram que indivíduos que vivem em áreas endêmicas para TB, como a Etiópia, apresentaram níveis mais elevados de anticorpos específicos aos antígenos do *M. tuberculosis* comparados com indivíduos que vivem em áreas não endêmicas, como a Dinamarca, e área de intermediária endemicidade, como o Brasil. Estes resultados sugerem, portanto, que ESAT-6 e CFP-10 podem auxiliar no diagnóstico da TB em populações de áreas não endêmicas e de intermediária endemicidade.

O antígeno 85B é um antígeno precocemente secretado pelo *M.tuberculosis*, que pode ser encontrado em 3 dias de cultura, por isso é considerado um apropriado candidato para o diagnóstico da TB (UMA DEVI, RAMALINGAM e RAJA, 2003). Seu potencial no diagnóstico sorológico para a tuberculose tem sido extensivamente estudado por muitos pesquisadores, e a sua sensibilidade para os casos de TB em adultos e em crianças pode variar de 41-94% e a especificidade de 75-100% (LIM et al. 1999; RAJA et al., 2001; UMA DEVI, RAMALINGAM e RAJA, 2003; RAJA et al. 2004). De acordo com os dados acima citados, obtivemos sensibilidade e especificidade relativamente satisfatória de 91% e 82%, respectivamente, porém, se comparado com os outros antígenos testados (ESAT-6, CFP-10) observamos que sua capacidade em discriminar indivíduos sadios dos infectados foi mais baixa. Coincidente com os nossos resultados, Abramo et al, (2006) observaram uma indução de respostas relativamente alta de IFN- γ e CXCL9 (anteriormente denominada MIG ou monocina induzida por IFN- γ) em controles sadios vacinados com BCG ao antígeno 85B. Provavelmente, elevadas respostas por anticorpos, IFN- γ e CXCL9 por indivíduos saudáveis estimulados pelo antígeno 85B podem ocorrer porque esta proteína está presente nas linhagens virulentas de micobactérias, nas

linhagens de *M.bovis*-BCG e também em micobactérias de ambiente (MOLLER e BORREBAECK, 1985).

16kDa é uma proteína citosólica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MANCA et al., 1997). Sua alta especificidade em ensaios sorológicos faz desta proteína uma forte candidata para o diagnóstico da TB (HAJA et al., 2002; JULIÁN et al., 2004). Entretanto, por ser mais bem expressa durante a fase estacionária de crescimento da micobactéria (YUAN, CRANE e BARRY, 1996), sua capacidade para o diagnóstico da TB ativa pode ser comprometida, apresentando maior eficiência no diagnóstico da TB latente, como foi sugerido por Demissie e colaboradores, (2006). De acordo com as características desta proteína, no presente trabalho foi observado sensibilidade de 61% e especificidade de 89% no diagnóstico da TB ativa. Haja et al, (2002), também observaram baixa sensibilidade de 62% e alta especificidade de 100% na detecção de IgG anti-16kDa no soro de crianças com baciloscopia e cultura positiva. Já Imaz e colaboradores, (2001), utilizando o antígeno 16kDa recombinante, obtiveram sensibilidade de 34% para IgG, 19% para IgA e 3% para IgM . Outro estudo desenvolvido por Senol e colaboradores (2007) utilizando o kit de ELISA Pathozime TB complex, (Omega diagnostics Ltd, Alloa, Scotland) para mensurar níveis de anticorpos IgG específicos no soro de pacientes com TB para o antígeno 16kDa em combinação com o antígeno 38kDa obtiveram sensibilidade de 52,5% e especificidade de 93,3%. Esses resultados mostram que o antígeno de 16kDa não é um bom indicador para o diagnóstico da TB ativa.

Equivalente aos trabalhos de Masungi et al. (2002) e Zanetti et al. (2004), neste estudo também foi possível detectar níveis significativos de anticorpos IgG anti-HBHA no soro de pacientes com tuberculose. Entretanto, apesar dos pacientes com tuberculose produzirem anticorpos contra o antígeno HBHA, a capacidade desta proteína em discriminar pacientes com TB ativa de indivíduos saudáveis foi de 70%. Esta baixa sensibilidade pode ter ocorrido porque a proteína nativa HBHA do *M. tuberculosis* sofre um processo de metilação envolvendo resíduos de lisina presentes no domínio C-terminal importante para indução de imunidade protetora ao *M. tuberculosis*. Já a proteína recombinante, utilizada neste estudo, não apresenta tais domínios metilados (TEMMERMAN et al., 2004), o que pode ter dificultado a discriminação de pacientes com TB ativa dos indivíduos saudáveis. Além de baixa sensibilidade, também foi observado que a especificidade foi mais baixa que a especificidade apresentada pelos demais antígenos avaliados neste trabalho. Isto

pode ser explicado porque a proteína HBHA é produzida por todos os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo o BCG (MENOZZI et al., 1996), como no Brasil é obrigatório a vacinação com o BCG, isto pode explicar a presença de anticorpos específicos ao HBHA no soro de indivíduos sadios BCG vacinados.

Além dos valores de sensibilidade e especificidade dos antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA, a análise dos valores da área sob a curva ROC e os valores de verossimilhança positivo confirmaram o melhor desempenho dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 comparados aos antígenos 85B, 16kDa e HBHA em discriminar pacientes com TB ativa dos indivíduos controle sadios BCG vacinado.

5.4 Pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentaram altos níveis de anticorpos IgG1 anti-ESAT-6 e anti-CFP-10

Pouca atenção tem sido atribuída a pesquisa das classes e subclasses de anticorpos no curso da tuberculose (GUPTA et al., 2005). Neste estudo, a análise das subclasses de IgG contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10, revelou uma predominância de anticorpos IgG1 em relação aos anticorpos IgG2 e IgG4 no soro de pacientes com TB ativa. Nossos resultados são consistentes com outros trabalhos que também observaram predominância de anticorpos IgG1 no soro de pacientes com TB (HUSSAIN et al., 1995; GUPTA et al., 2005). A importância da presença de anticorpos IgG1 na infecção pelo *M. tuberculosis* foi analisada por Hussain et al. (1995). Os autores mostraram que a opsonização por IgG1 regula a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, não alterando a produção de citocinas anti-inflamatória como IL-10, em monócitos estimulados por antígenos de micobactéria. Tais resultados sugerem uma possível função para IgG1 na tuberculose em estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e bloquear a produção de citocinas regulatórias. Interessantemente, observamos neste estudo que a predominância de IgG1 foi coincidente com os altos níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6 detectados em cultura de PBMC de pacientes com TB ativa, estimulados com o antígeno ESAT-6/CFP-10 por Almeida (2008), ao utilizar amostras dos mesmos pacientes estudados neste trabalho. Estes resultados sugerem uma possível ligação da produção de anticorpos IgG1 com o perfil Th1 de

citocinas produzidas na tuberculose. Entretanto novos estudos são necessários para estabelecer a possível contribuição de anticorpos na patogenia da TB.

6 CONCLUSÕES

1. Pacientes com TB pulmonar e TB extrapulmonar apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA do *M. tuberculosis* em comparação aos indivíduos controle BCG vacinados.
2. Os antígenos ESAT-6 e CFP-10 foram os que mais se destacaram para uma possível utilização no diagnóstico da TB, visto que na análise da curva ROC apresentaram melhor acurácia em relação aos demais antígenos.
3. Pacientes com TB pulmonar ativa apresentaram diminuição dos níveis de anticorpos IgG contra os antígenos ESAT-6, CFP-10, 85B, 16kDa e HBHA do *M. tuberculosis* após seis meses de quimioterapia anti-TB.
4. Os níveis de anticorpos IgG contra o antígeno 16kDa estavam maiores no soro de pacientes TB após 1-3 meses de quimioterapia anti-TB.
5. A análise das subclasses de IgG contra os antígenos ESAT-6 e CFP-10, revelou que a produção de anticorpos IgG1 foi predominante em relação aos anticorpos IgG2 e IgG4 no soro de pacientes com TB ativa.

REFERÊNCIAS

ABEBE, F.; HOLM-HANSEN, C.; WIKER, H.G.; BJUNE, G. 2007. Progress in serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, **66**: 176-191.

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

ALMEIDA, C.S. 2008. **Níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes com tuberculose determinados pelo ensaio citométrico de esferas ordenadas**. Dissertação (Mestrado em Imunologia, Genética e Biotecnologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Minas Gerais, Brasil, 115p.

ANDERSEN, P.; ASKGAARD, D.; LJUNGQVIST, L.; BENNEDSEN, J.; HERON, I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. **Infection and Immunity**, **59 (6)**: 1905-1910.

ANDERSEN, P.; ANDERSEN, A.B.; SORENSEN, A.L.; NAGAI, S. 1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **The Journal of Immunology**, **154 (7)**: 3359-3372.

ANDREU, J.; CÁCERES, J.; PALLISA, E.; MARTINEZ-RODRIGUES, M. 2004. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. **European Journal of Radiology**, **51**: 139-149.

ARAUJO, Z.; WAARD, J.H.; LARREA, C.F.; LOPEZ, D.; FANDIÑO, C.; MALDONADO, A.; HERNANDEZ, E.; OCAÑA, Y.; ORTEGA, R.; SINGH, M.; OTTENHOFF, T.H.M.; AREND, S.M.; CONVIT, J. 2004. Study of the antibody response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Warao Amerindian children in Venezuela. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, **99 (5)**: 517-524.

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

ARMITIGE, L.Y.; JAGANNATH, C.; WANGER, A.R.; NORRIS, S.J. 2000. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. **Infection and Immunity**, **68** (2): 767-778.

BECK, S.T.; LEITE, O.M.; ARRUDA, R.S.; FERREIRA, A.W. 2005. Combined use of western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, **9** (1): 35-43.

BECK, S.T.; LEITE, O.M.; ARRUDA, R.S.; FERREIRA, A.W. 2005. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38**: 587-596.

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

BOCCHINO, M.; MATARESE, A.; BELLOFIORE, B.; GIACOMELLI, P.; SANTORO, G.; BALATO, N.; CASTIGLIONE, F.; SCARPA, R.; PERNA, F.; SIGNORIELLO, G.; GALATI, D.; PONTICIELLO, A.; SANDUZZI, A. 2008. Performance of two commercial blood IFN- γ release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF- α treatment. **European Journal Microbiology Infection Disease**, **8**: 519-523.

BOMBARDA, S.; FIGUEIREDO, C.M.; FUNARI, M.B.G.; SOARES JR, J.; SEISCENTO, M.; FILHO, M.T. 2001. Imagem em tuberculose pulmonar. **Jornal de Pneumologia**, **27** (6): 329-340.

BOOM, W.H.; CANADAY, D.H.; FULTON, S.A.; GEHRING, A.J.; ROJAS, R.E.; TORRES, M. 2003. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, **83**: 98-106.

BOSIO, C.M.; GARDNER, D.; ELKINS, K.L. 2000. Infections of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. **The Journal of Immunology**, **164**: 6417-6425.

CACCAMO, N.; MILANO, S.; DI SANO, C.; CIGNA, D.; IVANYI, J.; KRENSKY, A.M.; DIELE, F.; SALERNO, A. 2002. Identification of epitopes of *Mycobacterium*

tuberculosis 16-kDa protein recognized by human leukocyte antigen-A *0201 CD8+ T lymphocytes . **The Journal of Infectious Disease**, **186**: 991-998.

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

CASCANTE, J.A.; PASCAL, I.; EGUÍA, V.M.; HUETO, J. 2007. Diagnosis of tuberculosis infection. **Anales Del Sistema Sanitario de Navarra**, **30 (Suppl. 2)**: 49-65.

CHEN, X.; ZHOU, B.; LI, M.; DENG, Q.; WU, X.; LE, X.; WU, C.; LARMONIER, N.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; WANG, H.; KATSANIS, E. 2007. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. **Clinical Immunology**, **123 (1)**: 50-59.

CHIANG, I.H.; SUO, J.; BAI, K.J.; LIN, T.P.; LUH K.T.; YU, C.J.; YANG P.C. 1997. Serodiagnosis of tuberculosis. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, **156**: 906-911.

COELHO, A.G.V.; ZAMARIOLI, L.A.; PEREIRA, C.M.; DUCA, B.F.L. 2007. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **33 (6)**: 707-711.

DAVIES, P.; GRANGE, J. 2001. The genetics of host resistance and susceptibility to tuberculosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **953**: 151-156.

DEMISSIE, A.; LEYTEN, E.M.S.; ABEBE, M.; WASSIE, L.; ASEFFA, A.; ABATE, G.; FLETCHER, H.; OWIAFE, P.; HILL, P.C.; BROOKES, R.; ROOK, G.; ZUMLA, A.; AREND, S.M.; KLEIN, M.; OTTENHOFF, T.H.M.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T.M.; VACSEL STUDY GROUP. 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, **13 (2)**: 179-186.

DE VALLIÈRE, S.; ABATE, G.; BLAZEVIC, A.; HEUERTZ, R.M.; HOFT, D.F. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. **Infection and Immunity**, **73 (10)**: 6711-6720.

DLUGOVITZKY, D.; BAY, M.L.; RATENI, L.; FIORENZA, G.; VIETTI, L.; FARRONI, M.A.; BOTTASSO, O. 2000. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). **Clinical & Experimental Immunology**, **122 (3)**: 343-349.

DROWART, A.; HUYGEN, K.; DE BRUYN, J.; YERNAULT, J.C.; FARBER, C.M.; VAN VOOREN, J. P. 1991. Antibody levels to whole culture filtrate antigens and to purified P32 during treatment of smear-positive tuberculosis. **Chest**, **100 (3)**: 685-687.

ELLNER, J.J. 1997. Review: the immune response in human tuberculosis – implications for tuberculosis control. **The Journal of Infectious Diseases**, **176**: 1351-1359.

ESPINAL, M.A. 2003. The Global situation of MDR-TB. **Tuberculosis**, **83**: 44-51.

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

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

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

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M.; DAVOUST, J.; VAN EDERT, P.; AMIGORENA, S. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, **425 (6956)**: 397-402.

FUNASA. 2004. Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **30 (Supl. 1)**: 57-85.

GREENAWAY, C.; LIENHARDT, C.; ADEGBOLA, R.; BRUSASCA, P.; McADAM, K.; MENZIES, D. 2005. Humoral responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. **The International Journal Tuberculosis and Lung Disease**, **9 (10)**: 1112-1119.

GUPTA, S.; SHENDE, N.; BHATIA, A.S.; KUMAR, S.; HARINATH, B.C. 2005. IgG subclass antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis. **Medical Science Monitor**, **11 (12)**: 585-588.

HARBOE, M.; OETTINGER, T.; WIKER, H.G.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P.; 1996. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. **Infection and Immunity**, **64 (1)**: 16-22.

HARBOE, M.; MALIN, A.S.; DOCKRELL, H.S.; WIKER, H.G.; ULVUND, G.; HOLM, A.; JORGENSEN, M.C.; ANDERSEN, P. 1998. B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **66 (2)**: 717-723.

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

HIJJAR, M.A.; OLIVEIRA, M.J.P.R.; TEIXEIRA, G.M. 2001. A tuberculose no Brasil e mundo. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, **9 (2)**: 9-16.

HINRICHSEN, S.L. 2005. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, cap. 38, p. 281-296.

HOFF, S.T.; ABEBE, M.; RAVN, P.; RANGE, N.; MALENGANISHO, W.; RODRIGUES, D.S.; KALLAS, E.G.; SOBORG, C.; DOHERTY, M.; ANDERSEN, P.; WELDINGH, K. 2007. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil and Denmark. **Clinical Infectious Disease**, **45**: 575-582.

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

HUSSAIN, R.; DAWOOD, G.; ABRAR, N.; TOOSI, Z.; MINAI, A.; DOJKI, M.; ELLNER, J. 1995. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclasses responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **2 (6)**: 726-732.

IMAZ, M.S.; ZERBINI, E. 2000. Antibody response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* during and after treatment of tuberculosis patients. **The International Journal Tuberculosis and Lung Disease**, **4 (6)**: 562-569.

IMAZ, M.S.; COMINI, M.A.; ZERBINI, E.; SEQUEIRA, M.D.; SPOLETTI, M.J.; ETCHART, A.A.; PAGANO, H.J.; BONIFASICH, E.; DÍAZ, N.; CLAUS, J.D.; SINGH, M. 2001. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. **The International Journal Tuberculosis and Lung Disease**, **5 (11)**: 1036-1043.

INDERLIED, C.B.; KEMPER, C.A.; BERMUDEZ, L.E.M. 1993. The *Mycobacterium avium* Complex. **Clinical Microbiology Reviews**, **6 (3)**: 266-310.

JOHNSON, C.M.; COOPER, A.M.; FRANK, A.A.; BONORINO, C.B.C.; WYSOKI, L.J.; ORME, I.M. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. **Tubercle and Lung Disease**, **78**: 257-261.

JULIÁN, E.; MATAS, L.; ALCAIDE, J.; LUQUIN, M. 2004. Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **11 (1)**: 70-76.

KANUNFRE, K.A.; LEITE, O.H.M.; LOPES, M.I.; LITVOC, M.; FERREIRA, A.W. 2008. Enhancement of diagnostic efficiency by a gamma interferon release assay for pulmonary tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, **15 (6)**: 1028-1030.

KAUFMANN, S.H.E. 1993. Immunity to intracellular bacterium. **Annual Review of Immunology**, **11**: 129-163.

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

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

KEANE, J., REMOLD, H.G., KORNFELD, H. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **The Journal of Immunology**, **164**: 2016-2020.

KHOMENKO, A.G.; BAYENSKY, A.V.; CHERNOUSOVA, L.N.; KULIKOVSKAYA, N.V.; DEMIANENKO, N.V.; LITVINOV, V.I. 1996. Serodiagnosis of tuberculosis: detection of mycobacterial antibodies and antigens. **Tubercle and Lung Disease**, **77**: 510-515.

KRUTZIK, S.R.; MODLIN, R.L. 2004. The role of Toll-Like receptors in combating mycobacteria. **Seminars in Immunology**, **16 (1)**: 35-41.

LAURENS, A.H.; PINXTEREN, V.; RAVN, P.; AGGER, E.M.; POLLOCK, J.; ANDERSEN, P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CPF10. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **7 (2)**: 155-160.

LAW, K.; WEIDEN, M.; HARKIN, T.; TCHOU-WONG, K.; CHI, C.; ROM, W.N. 1996. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **153 (2)**: 799-804.

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

LIM, J.H.; PARK, J.K.; JO, E.K.; SONG, C.H.; MIN, D.; SONG, Y.J.; KIM, H.J. 1999. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **67 (11)**: 6187-6190.

MAEKURA, R.; NAKAGAWA, M.; NAKAMURA Y.; HIRAGA, T.; YAMAMURA, Y.; ITO, M.; UEDA, E.; YANO, S.; HE, H.; OKA, S. 1993. Clinical evaluation of rapid serodiagnosis of pulmonary tuberculosis by ELISA with cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) as antigens purified from *Mycobacterium tuberculosis*. **The American Review of Respiratory Disease**, **148**: 997-1001.

MAGLIONE, P.J.; XU, J.; CHAN, J. 2007. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, **178**: 7222-7234.

MAGLIONE, P.J.; XU, J.; CASADEVALL, A.; CHAN, J. 2008. Fc γ receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Immunology**, **180**: 3329-3338.

MAGLIONE, P.J.; CHAN, J. 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Immunology**, **39**: 676-686.

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

MANCA, C.; LYASHCHENKO, K.; WIKER, H.G.; USAI, D.; COLANGELI, R.; GENNARO, M.L. 1997. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **65 (1)**: 16-23.

MASSON, C.M.; PORRETTA, E.; ZHANG, P.; NELSON, S. 2007. CD4+CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. **Clinical and experimental Immunology**, **148**: 537-545.

MASUNGI, C.; TEMMERMAN, S.; VOOREN, J.P.V.; DROWART, A.; PETHE, K.; MENOZZI, F.D.; LOCHT, C.; MASCART, F. 2002. Differential T and B cell responses against *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin adhesin in infected healthy individuals and patients with tuberculosis. **The Journal of Infectious Disease**, **185**: 513-520.

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

MEDRONHO RA, CARVALHO DM, BLOCH KV, LUIZ RR, WERNECK GL. 2003. Epidemiologia. Ed Atheneu. São Paulo, SP.

MEHER, A.K.; LELLA, R.K.; SHARMA, C.; ARORA, A. 2007. Analysis of complex formation and immune response of CFP-10 and ESAT-6 mutants. **Vaccine**, **25**: 6098-6106.

MENOZZI, F.D.; ROUSE, J.H.; ALAVI, M.; LAUDE-SHARP, M.; MULLER, J.; BISCHOFF, R.; BRENNAN, M.J.; LOCHT, C. 1996. Identification of a Heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. **The Journal of Experimental Medicine**, **184**: 993-1001.

MINEO JR, SILVA DAO, SOPELETE MC, LEAL GS, VIDIGAL LHG, TÁPIA LER, BACCHIN MI. 2005. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Ed EDUFU. Uberlândia, MG.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA 2000. **Tuberculose. In: Doenças infecciosas e parasitárias.** Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 2ª edição. Pp197.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA 2002. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço.** Rio de Janeiro. 5ª ed. Pp236.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Brasília. 6ª ed. Pp. 322.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Pp.816.

MOOLER, S.A.; BORREBAECK. 1985. A filter immune-plaque assay for the detection of antibody-secreting cells in vitro. **Journal Immunology Methods, 79:** 195-204.

MORAN, A.J.; TREIT, J.D.; WHITNEY, J.L.; ABOMOELAK, B.; HOUGHTON, R.; SKEIKY, Y.A.W.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R.; NANO, F.E. 2001. Assessment of the serodiagnostic potential of nine novel proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology Letters, 198:** 31-36.

MORENS, D.M.; FOLKERS, G.K.; FAUCI, A.S. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infections disease. **Nature, 430 (6996):** 242-249.

MORRONE, N.; CRUVINEL, M.C.; MORRONE JR, N.; FREIRE, J.A.S.; OLIVEIRA, L.M.L.; GONÇALVES, C. 2003. Pneumopatia causada por *Mycobacterium Kansasi*. **Jornal de Pneumologia, 29 (6):** 341-349.

MURRAY, P.J. 1999. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. **Trends in Microbiology, 7 (9):** 366-372.

MUSTAFA, A.S.; OFTUNG, F.; AMOUDY, H.A.; MADI, N.M.; ABAL, A.T.; SHABAN, F.; KRANDS, I.R.; ANDERSEN, P. 2000. Multiple epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. **Clinical Infectious Disease, 30 (Suppl. 3):** 201-205.

NAGAI, S.; WIKER, H.G.; HARBOE, M.; KINOMOTO, M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **59 (1)**: 372-382.

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

NOGUEIRA, L.L.; DAHLSTRON, P.; CARDOSO, F.C.; MORENO, F.; FROTA, C.C.; CAVADA, B.S.; MATTOS, AM.; TEIXEIRA, H.C.; OLIVEIRA, S.C.; BARRAL-NETO, M.; BAFICA, A. 2008. A novel ricin-like lectin from *Mycobacterium tuberculosis*: from bioinformatics analysis to immune recognition. In: **XXXIII Meeting of the Brazilian Society for Immunology – II Extra Section of Clinical Immunology**. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

NORTH, R.J.; JUNG, Y.J. 2004. Immunity to tuberculosis. **Annual Reviews of Immunology**, **22**: 599- 623.

PALMA-NICOLÁS, J.P.; BOCANEGRA-GARCIA, V. 2007. Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients. **Archivos de Bronconeumologia**, **43 (4)**: 225-232.

PEREIRA, S.M.; DANTAS, O.M.S.; XIMENES, R.; BARRETO, M.L. 2007. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Revista de Saúde Pública**, **41**: 59-66.

PETHE, K.; ALONSO, S.; BIET, F.; DELOGU, G.; BRENNAN, M.J.; LOCHT, C.; MENOZZI, F.D. 2001. The Heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. **Nature**, **412**: 190-194.

PETHE, K.; PUECH, V.; DAFFÉ, M.; JOSEPHANS, C.; DROBECQ, H.; LOCHT, C.; MENOZZI, F.D. 2001. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. **Molecular Microbiology**, **39 (1)**: 89-99.

PETHE, K.; BIFANI, P.; DROBECQ, H.; SERGHERAERT, C.; DEBRIE, A.S.; LOCHT, C.; MENOZZI, F.D. 2002. Mycobacterial Heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American**, **99 (16)**: 10759-10764.

PILHEU, J.A. 1998. Tuberculosis 2000: problems e solutions. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, **2 (9)**: 696-703.

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

PORTAELS, F. 1995. Epidemiology of Mycobacterial Diseases. **Clinics in Dermatology**, **13**: 207-222.

PINXTEREN, L.A.H.; RAVN, P.; AGGER, E.M.; POLLOCK, J.; ANDERSEN, P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **7 (2)**: 155-160.

RAJA, A.; RANGANATHAN, U.D.; BETHUNAICKAN, R.; DHARMALINGAM, V. 2001. Serologic response to a secreted and a cytosolic antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, **20 (12)**: 1161-1164.

RAJA, A.; UMA DEVI, K.R.; RAMALINGAM, B.; BRENNAM, P.J. 2002. Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **9 (2)**: 308-312.

RAJA, A. 2004. Immunology of tuberculosis. **Indian Journal of Medicine Research**, **120**: 213-232.

RAJA, A. UMA DEVI, K.R.; RAMALINGAM, B.; BRENNAM, P.J. 2004. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of free and immune complex-bound anti-30kDa antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **50**: 253-259.

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

RODRIGUES, M.F.; BARSANTE, M.M.; ALVES, C.C.S.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P.; AMARANTE-MENDES, G.P.; TEIXEIRA, H.C. 2009. Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. **Immunology**. ISSN: 1365-2567.

ROSENKRANDS, I.; AAGAARD, C.; WELDINGH, K.; BROCK, I.; DZIEGIEL, M.H.; SINGH, M.; HOFF, S.; RAVN, P.; ANDERSEN, P. 2008. Identification of Rv0222 from RD4 as a novel serodiagnostic target for tuberculosis. **Tuberculosis**, **88**: 335-343.

ROY, E.; STAVROPOULOS, E.; BRENNAN, J.; COADE, S.; GRIGORIEVA, E.; WALKER, B.; DAGG, B.; TASCAN, R.E.; LOWRIE, D.B.; COLSTON, M.J.; JOLLES S. 2005. Therapeutic efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Infection and Immunity**, **73 (9)**: 6101-6109.

SALTINI, C. 2006. Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, **100**: 2085-2097.

SEPKOWITZ, K.A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T.E.; ARMSTRONG, D. 1995. Tuberculosis in the AIDS era. **Clinical Microbiology Reviews**, **8 (2)**: 180-199.

SCHLESINGER, L.S. 1996. Role of mononuclear phagocytes in *M. tuberculosis* pathogenesis. **Journal of Investigative Medicine**, **44**: 312-323.

SCHLUGER, N.W.; ROM, W.N. 1998. The host immune response to tuberculosis. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, **157**: 679-691.

SENOL, G.; ERER, O.F.; YALCIN, Y.A.; COSKUN, M.; GÜNDÜZ, A.T.; BIÇMEN, C.; ERTAS, M.; OZKAN, S.A. 2007. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. **European Respiratory Journal**, **29**: 143-148.

SINGH, S. 2004. Tuberculosis. **Current Anaesthesia & Critical Care**, **15**: 165-171.

SIRECI, G.; DIELI, F.; LIBERTO, D.; BUCCHERI, S.; MANNA, M.P.L.; SCARPA, F.; MACALUSO, P.; ROMANO, A.; TITONE, L.; CARLO, P.; SINGH, M.; IVANYI, J.; SALERNO, A. 2007. Anti-16-kilodalton mycobacterial protein immunoglobulin M levels in healthy but purified protein derivative-reactive children decrease after chemoprophylaxis. **Clinical and Vaccine Immunology**, **14 (9)**: 1231-1234.

SOUZA, M.A.; SILVA, A.G.; AFONSO-CARDOSO, S.R.; FAVORETO JR, S.; FERREIRA, M.S. 2005. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **38**: 137-141.

SOYSAL, A.; TORUN, T.; EFE, S.; GENCER, H.; TAHAOGLU, K.; BAKIR, M. 2008. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of *M. tuberculosis* infection. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, **12 (1)**: 50-56.

SPENSER, J.S.; KIM, H.J.; MARQUES, A.M.; GONZALEZ-JUARERRO, M.; LIMA, M.C.B.S.; VISSA, V.D.; TRUMAN, R.W.; GENNARO, M.L.; CHO, S.N.; COLE, S.T.; BRENNAN, P.J. 2004. Comparative analysis of B- and T-cell epitopes of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein 10. **Infection and Immunity**, **72 (6)**: 3161-3170.

STARKE, J.R. 1997. Prevention of tuberculosis infection and disease. **Seminars in Pediatric Infection Disease**, **8 (2)**: 85-95.

TEITELBAUM, R.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; CHEN, B.; ROBBINS, J.B.; UNANUE, E.; CASADEVALL, A.; BLOOM, B.R. 1998. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American**, **95**: 15688-15693.

TEIXEIRA, F.M.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A.P.; RODRIGUES, M.F; AZEVEDO, V.; MACEDO, G.C.; OLIVEIRA, S.C. 2006. DNA vaccine using *Mycobacterium bovis* Ag85B antigen induces partial protection against experimental infection in BALB/c mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, **13 (8)**: 1-6.

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

TEMMERMAN, S.; PETHE, K.; PARRA, M.; ALONSO, S.; ROUANET, C.; PICKETT, T.; DROWART, A.; DEBRIE, A.S.; DELOGU, G.; MENOZZI, F.D.; SERGHERAERT, C.; BRENNAN, M.J.; MASCART, F.; LOCHT, C. 2004. Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. **Nature Medicine**, **10 (9)**: 935-941.

TJÄRNLUND, A.; RODRÍGUEZ, A.; CARDONA, P.J.; GUIRADO, E.; IVANYI, J.; SINGH, M.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. 2006. Polimeric IgR Knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild-type mice. **International Immunology**, **18 (5)**: 807-816.

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F.; SILVA, N.P. 1996. **Microbiologia**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 386p.

UMA DEVI, K.R.; RAMALINGAM, B.; RAJA, A. 2003. Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* 30 and 16kDa antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **46**: 205-209.

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

VALADAS, E.; ANTUNES, F. 2005. Tuberculosis, a re-emergent disease. **European Journal of Radiology**, **55**: 154-157.

VERBON, A.; HARTSKEERL, R.A.; SCHUITEMA, A.; KOLK, A.H.J.; YOUNG, D.B.; LATHIGRA, R. 1992. The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. **Journal of Bacteriology**, **174 (4)**: 1352-1359.

VERMA, R.K.; JAIN, A. 2007. Antibodies to mycobacterial antigens for diagnosis of tuberculosis. **Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiology**, **51**: 453-461.

VORDERMEIER, H.M.; VENKATAPRASAD, N.; HARRIS, D.P.; IVANYI, J. 1996. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. **Clinical and Experimental Immunology**, **106**: 312-316.

WANG, B.L.; XU, Y.; LI, Z.M.; XU, Y.M.; WENG, X.H.; WANG, H.H. 2005. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, **9 (12)**: 1327-1334.

WANG, X.; BARNES, P.F.; DOBOS-ELDER, K.M.; TOWNSEND, J.C.; CHUNG, Y.; SHAMS, H.; WEIS, S.E.; SAMTEN, B. 2009. ESAT-6 inhibits production of IFN- γ by *Mycobacterium tuberculosis*-responsive human T cells. **The Journal of Immunology**, **182**: 3668-3677.

WELDINGH, K.; ROSENKRANDS, I.; OKKELS, L.M.; DOHERTY T.M.; ANDERSEN, P. 2005. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, **43 (1)**: 57-65.

WINAU, F.; WEBER, S.; SAD, S.; DIEGO, J.; HOOPS, S.L.; BREIDEN, B.; SANDHOFF, K.; BRINKMANN, V.; KAUFMANN, S.H.E.; SCHAIBLE, U.E. 2006. Apoptotic Vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, **24**: 105-117.

WHO. 2007. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. Geneva, World Health Organization. Publication WHO/HTM/TB/2007.267.

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

YUAN, Y.; CRANE, D.D.; SIMPSON, R.M.; ZHU, Y.; HICKEY, M.J.; SHERMAN, D.R.; BARRY, C.E. 1998. The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of American**, **95**: 9578-9583.

ZANETTI, S.; BUA, A.; DELOGU, G.; PUSCEDDU, C.; MURA, M.; SABA, F.; PIRINA, P.; GARZELLI, C.; VERTUCCIO, C.; SECHI, L.A.; FADDA, G. 2005. Patients with pulmonary tuberculosis develop a strong humoral response against methylated heparin-binding hemagglutinin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **12 (9)**: 1135-1138.