

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

YONE VILA NOVA CAVALCANTI

**Avaliação do perfil de produção e expressão de mediadores da
resposta imune celular em comunicantes e indivíduos com
história de tuberculose pulmonar**

Recife

2012

YONE VILA NOVA CAVALCANTI

Avaliação do perfil de produção e expressão de mediadores da resposta imune celular em comunicantes e indivíduos com história de tuberculose pulmonar

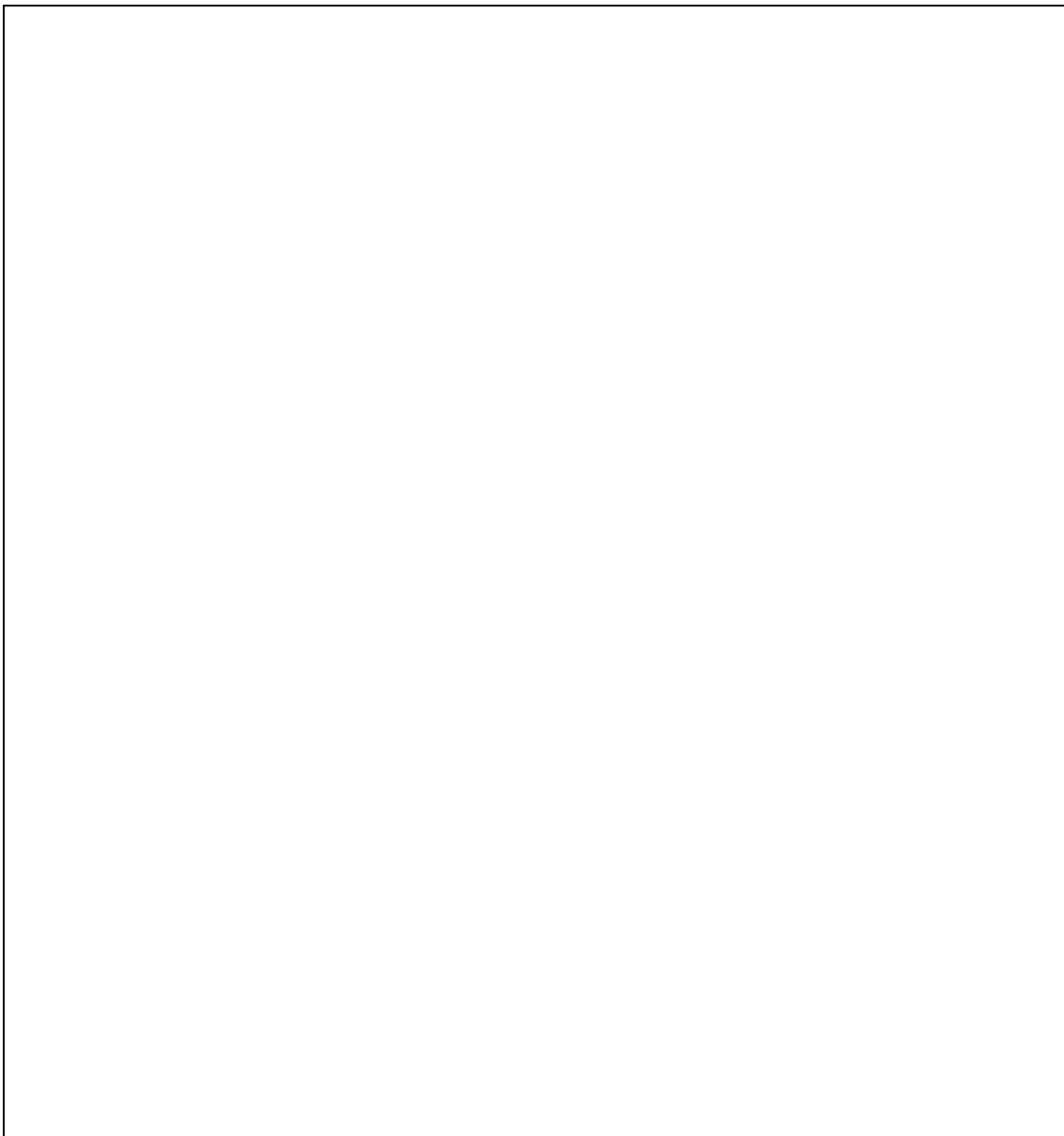
**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Doutor em Inovação Terapêutica**

Orientador(a): Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

**Recife
2012**

<p>Cavalcanti, YVN</p> <p>Avaliação do perfil de produção e expressão de mediadores da resposta imune celular em comunicantes e indivíduos com história de tuberculose pulmonar.</p>	<p>2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização</p>
<p>Doutorado PPGITUFPE 2012</p>	

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cavalcanti, Yone Vila Nova

Avaliação do perfil de produção e expressão de mediadores da resposta imune celular em comunicantes e indivíduos com história de tuberculose pulmonar/ **Yone Vila Nova Cavalcanti– Recife: O Autor, 2012.**

111 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Rego Alves Pereira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Tuberculose 2. Citocinas 3. *Mycobacterium tuberculosis* I.
Pereira, Valéria Rego Alves (orientadora) II. Título

616.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 313

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dra. Maria Eduarda Lacerda Larrazábal da Silva

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CAVALCANTI, Yone Vila Nova Cavalcanti

Título: Avaliação do perfil de produção e expressão de mediadores da resposta imune celular em comunicantes e indivíduos com história de tuberculose pulmonar

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dra. Valdênia Souza

Instituição: Deptº. de Ciências Farmacêuticas / UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Vláudia M^a Assis Costa

Instituição: Deptº. de Parasitologia / UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

Instituição: Deptº. de Bioquímica / UFPE

Assinatura: _____

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

Instituição: Depto. de Imunologia/ CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituição: Depto. de Imunologia/ CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados filhos Rayana e Gabriel, ao meu marido Clemílio Júnior,
e à minha mãe Margarida que estiveram presentes com paciência e dedicação
em mais uma etapa de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Nosso Deus que em momento algum deixei de acreditar que iria me dar forças para vencer mais essa etapa de minha vida.

À Dra. Valéria Pereira, pela orientação, sugestões, idéias, dedicação, apoio técnico e, acima de tudo pelo respeito e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica.

À Direção do CPqAM, Dr. Eduardo Freese de Carvalho, por todo o apoio que me foi concedido.

À equipe especial que participou diretamente da realização deste trabalho, Thays Miranda, Maria Carolina Accioly, Marcílio Baliza, Eduardo Moura Nascimento, Juliana Kelle, Edeneide Xavier, Luiza Reis e Amanda Ferreira dedicando horas de suas trajetórias profissionais e pessoais com sinceridade, lealdade, respeito, amizade e profissionalismo.

A bibliotecária do CPqAM, especialmente Márcia Saturnino, pelo empenho na obtenção de preciosas referências bibliográficas.

Ao Laboratório de Métodos Quantitativos do Departamento de Saúde Coletiva do CPqAM/FIOCRUZ, pelas análises estatísticas cuidadosamente realizadas por George Tadeu Diniz.

Aos técnicos Mineo Nakazawa e Leonardo Dutra, do Departamento de Imunologia do CPqAM, pelo envolvimento profissional.

Ao pesquisador Roberto Pereira Werkhauser que dedicou precioso tempo em incentivos e esclarecimento de dúvidas.

A pesquisadora Dra. Norma Lucena Cavalcanti L. da Silva, pela grande contribuição na captação dos pacientes e profissionalismo.

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas”...

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

CAVALCANTI, Y.V.C. Avaliação do perfil de produção e expressão de mediadores da resposta imune celular em comunicantes e indivíduos com história de tuberculose pulmonar. 2012. 150f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A tuberculose pulmonar é um problema de saúde pública mundial e apresenta alta incidência no Brasil. Atualmente, o Brasil ocupa o 19º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos em todo o mundo. A resposta imune humana contra a tuberculose é especialmente mediada pelos linfócitos T CD4+. Entretanto, muitos estudos ainda são necessários para o entendimento exato do papel de cada citocina no mecanismo de cura da doença. A fim de caracterizar a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, o óxido nítrico (NO) e a expressão do marcador Foxp3, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos intradomiciliares de indivíduo com tuberculose pulmonar com (CTb) e sem (STb) história prévia de TB foram estimuladas *in vitro* com antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* (AgTb) e com o mitógeno Concanavalina A por 24 e 48 horas. A dosagem das citocinas foi feita por ELISA de captura e de NO pela quantificação do nitrito (NO_2^-). PCR em Tempo Real foi a técnica utilizada para detectar o mRNA para Foxp3. Em 24 horas de cultivo celular com antígeno total de *M. tuberculosis* (CTb = $10.158,38 \pm 7.438,38$; STb = $15.083,10 \pm 9.292,66$), observou-se uma produção significativa de TNF- α (0,05) no grupo STb. Os grupos analisados não apresentaram diferenças na expressão do mRNA do marcador Foxp3. Foi verificado aumento ($p= 0,04$) entre IL-10 e Foxp3 e correlação negativa ($p = 0,009$) entre NO (aumento) e Foxp3 (diminuição) após 48h de estímulo com AgTb. Observou-se também no grupo STb em 24 horas de culturas estimuladas com AgTb um resultado semelhante ao grupo CTb ($p = 0,03$). Portanto, os resultados obtidos sugerem que produção de IL-10, IFN- γ e de NO indicam que os indivíduos CTb e STb produziram uma resposta celular específica; porém, sem valores que possam indicar uma maior ou menor susceptibilidade à doença, e que TNF- α , possivelmente funciona como um elemento fundamental para a manutenção do estado de saúde dos comunicantes. A expressão do marcador Foxp3 não está associada diretamente a uma maior predisposição nos indivíduos com história de tuberculose pulmonar.

Palavras-chave: Tuberculose, citocinas, NO, Foxp3, comunicantes

ABSTRACT

CAVALCANTI, Y.V.C. **Evaluation of the production and expression profile of mediators of the immune response in communicants and individuals with pulmonary tuberculosis history.** 2012. 150p. Thesis (Doctorate). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Pulmonary tuberculosis is a global public health problem, presenting high incidence in Brazil. Brazil nowadays ranks 19th among the 22 countries that, together, account for 80% of all TB cases worldwide. Human immune response against tuberculosis is specially mediated by CD4⁺ T lymphocytes. However, many studies are still needed for the complete understanding of the role for each cytokine in the cure mechanisms of the disease. To further characterize the production of the cytokines TNF-alpha, INF-gamma, IL-10 and nitric oxide, as well as the expression of the Foxp3 marker, peripheral blood mononucleated cells were collected from intradomiciliary contacts of patients with pulmonary tuberculosis with or without previous history of active infection. These cells were stimulated *in vitro* with *Mycobacterium tuberculosis* antigen (TbAg) and with the mitogen Concanavalin A for 24 and 48 hours. The cytokine production was accessed through direct ELISA and the NO production through nitrite quantification (NO₂). Real time PCR was used for detecting Foxp3 mRNA. In 24 hours of cell culture with *M. tuberculosis* crude antigen (CTb = 10.158,38 ± 7.438,38; STb = 15.083,10 ± 9.292,66), it was observed a significant production of TNF-alpha (0.05) in the STb group. The groups analyzed did not show difference in the expression of Foxp3 mRNA. Positive correlation was observed between TNF-alpha and Foxp3 in the cells stimulated for 24 hours ($p=0.03$) and 48 hours ($p=0.02$) with TbAg, considering CTb and STb combined. Considering only CTb, it was observed a positive correlation ($p=0.04$) between IL-10 and Foxp3 and a negative correlation ($p=0.009$) between NO and Foxp3 after 48 hours stimuli with TbAg. Negative correlation was also observed in the STb group in 24 hours culture of cells stimulated with TbAg ($p=0.03$). Therefore, the results obtained suggest that regulatory immune mechanisms are possibly present in the individuals analyzed and that in a prior moment, primordial factors such as the presence of predisposing genetic components may have contributed to the progress of the disease in the CTb group.

Key words: Tuberculosis, cytokines, NO, FOX-P3, communicants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1	Resposta protetora inicial ao <i>M. tuberculosis</i> 11
Figura 2	Seleção de pacientes do presente estudo. 39
Figura 3	Freqüência de parasitas intestinais na população estudada em indivíduos positivos 52
Figura 4	Produção de IFN- γ em 24 e 48 horas de estímulo com antígeno total do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em indivíduos CTb e STb 53
Figura 5	Produção de IFN- γ em 24 e 48 horas de estímulo com antígeno total do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> X PPD em indivíduos STb 54
Figura 6	Produção de IL-10 em STb e CTb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb 55
Figura 7	Produção de IL-10 em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD 56
Figura 8	Produção de IL-10 em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD 57
Figura 9	Produção de TNF- α em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD 58
Figura 10	Produção de NO durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag TB em PBMC de indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar 59
Figura 11	Produção de NO em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD 59
Figura 12	Expressão gênica para mRNA Foxp3 por PBMC de indivíduos com história de Tuberculose (CTb) e de indivíduos sem história de Tuberculose (STb). Nota: As células foram estimuladas por Concavalina A (ConA, 2,5ug/ml) e Antígeno de <i>M. tuberculosis</i> (AgTb,10ug/ml) 59
Figura 13	Expressão gênica do mRNA do marcador Foxp3 X PPD em indivíduos STb 60
Figura 14	Correlação IL-10 X Foxp3 (48 horas) grupo CTb 62
Figura 15A	Correlação NO X Foxp3 (48 horas) grupo CTb 62
Figura 15B	Correlação NO X Foxp3 (24 horas) grupo STb 62

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Estudos de citocinas associadas à infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> no período de 1995-2012. 35
Tabela 2	Dados descritivos da população estudada. 49
Tabela 3	Lista de parasitas diagnosticados nas 34 famílias selecionadas 51
Tabela 4	Freqüência de enteroparasitoses por grupo estudado de indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar 52
Tabela 6	Produção de IFN- γ (pg/ml) X Marca de BCG 54 Expressão gênica do mRNA do marcador Foxp3 em indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar 60

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ABTS	2', 2'- Azino-Bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
AgTb	Antígeno Total do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CD1	Cluster of differentiation
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CTb	Comunicante com história prévia de tuberculose pulmonar
ELISA	Enzyme Like Immunosorbent Assay
ESAT-6	6-Kda Early Secreted Antigenic Target
Foxp3	Fator de Transcrição Foxp3
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
INH	Isoniazida
LACEM	Laboratório Central do Estado
LPS	Lipopolisacarídeo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
RMM	Receptor de Manose do Macrófago
mRNA	RNA mensageiro
NFAT-AP-1	Fator Nuclear das Células T Ativadas

NK	Linfócitos Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PBMC	Células Polimorfonucleares
PBS	Tampão Sódio Fosfato
PPD	Derivado Protéico Purificado
RFP	Rinfamicina
RNI	Reativos Intermediários do Nitrogênio
ROI	Reativos Intermediários do Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SFB	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
STb	Comunicante sem história prévia de tuberculose pulmonar
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multirresistente
TCD4+	Linfócitos T auxiliares
TCD8+	Linfócitos T citotóxicos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento transformador-beta
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Geral	3
2.2	Específicos	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	Aspectos Gerais	4
3.2	Aspectos Imunológicos	8
	Interferon Gama (IFN- γ)	13
	Fator de Necrose Tumora (TNF- α)	16
	Interleucina 10 (IL-10)	18
	Outras Citocinas envolvidas na tuberculose	20
	Óxido Nítrico (NO)	23
	Fator de Transcrição FoxP3 (Foxp3)	26
3.3	Citocinas em comunicantes de casos de tuberculose	30
4	METODOLOGIA	37
4.1	Tipo de Estudo	37
4.2	Seleção dos Pacientes	38
4.3	Parasitológico de Fezes	39
4.4	Obtenção do Antígeno total de <i>M. tuberculosis</i>	40
4.5	Obtenção de células Mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	41
4.6	Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas	42
4.7	Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura	42
4.8	Dosagem de Óxido Nítrico em sobrenadante de cultura de PBMCs	43

4.9	Detecção e quantificação de Foxp3	44
4.9.1	Purificação de RNA	44
4.9.2	Ensaio de transcrição reversa	45
4.9.3	Avaliação da expressão gênica para Foxp3	46
4.10	Análise Estatística	47
5	RESULTADOS	48
5.1	População de Estudo	48
5.2	Parasitológicos	50
5.3	Avaliação da produção de IFN- γ	52
5.4		
5.5	Avaliação da produção de IL-10	55
5.6	Avaliação da produção de TNF- α	56
5.7	Avaliação da produção de Óxido Nítrico	58
5.8	Expressão Gênica para Foxp3 por PBMC	60
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	78
8	REFERÊNCIAS	79
9	ANEXOS	
10	APÊNDICES	

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* apresenta mais de 100 espécies conhecidas, com ampla distribuição geográfica. *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo intracelular facultativo, é a espécie mais freqüentemente isolada em casos de tuberculose (TB) humana. A tuberculose pulmonar é um problema de saúde pública mundial e apresenta alta incidência no Brasil. Ainda é a principal causa de morte por um único agente infeccioso. Estima-se que, em média, uma pessoa com TB ativa possa infectar entre 10 e 15 indivíduos por ano (WHO, 2011).

Os dados da Organização Mundial de Saúde em 2010 indicaram para o Brasil uma taxa de mortalidade de 2.6/100.000 habitantes com prevalência de 47/100.000 habitantes e uma taxa de incidência que mantém 43/100.000 habitantes (WHO, 2011). Atualmente, o Brasil ocupa o 19º lugar entre os 22 países que concentram 80% dos casos em todo o mundo. Nesta lista, quanto mais elevada é a posição ocupada pelo país, melhor é a situação. Com relação à incidência, o Brasil é o 108º colocado. De acordo com os dados do Ministério da Saúde, Pernambuco ainda ocupa o 3º lugar no Brasil em incidência da doença com 46/100.00 habitantes (SINAN, 2012).

Sabe-se que o desenvolvimento da tuberculose está associado com o “status” imunológico e que a resposta imunológica protetora do hospedeiro contra este patógeno é mediada pela imunidade celular, onde algumas citocinas e células Th1 têm papel crítico (KINJO et al., 2002). A compreensão dos mecanismos envolvidos nesta resposta, e em particular, da função da rede de citocinas envolvida na doença, é de significativa relevância para que

avanços no desenvolvimento de formas efetivas de controle e prevenção sejam alcançados (RAJA, 2004).

Nessa perspectiva, o estudo dos comunicantes intradomiciliares de casos de TB é essencial para os programas de combate e controle da tuberculose, como um dos meios para o diagnóstico precoce dos casos de TB e diminuição da disseminação da doença (GAZETA et al., 2008).

A detecção de mediadores solúveis (citocinas e óxido nítrico) e marcadores moleculares implicados na resposta contra a micobactéria pode revelar potenciais marcadores de proteção nos indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* que apresentem as mesmas condições sócio-ambientais. Além disso, entender a participação de citocinas e de outros mediadores na resposta imune do hospedeiro humano, pode favorecer potencial aplicação imunoterápica no tratamento de pacientes TB multirresistentes a drogas e o desenvolvimento de novas vacinas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar e comparar a participação de mediadores solúveis e moleculares na resposta imune de comunicantes com história de tuberculose pulmonar e comunicantes sem história de tuberculose pulmonar.

2.2. Específicos

Quantificar a produção das citocinas interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alpha (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10) e de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura de PBMC (células mononucleares do sangue periférico) de indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar após estímulo *in vitro* com antígeno total de *Mycobacterium tuberculosis*;

Quantificar a expressão de mRNA para o marcador FoxP3 em cultura de células T regulatórias de cultura de PBMC de indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar após estímulo *in vitro* com antígeno total de *M. tuberculosis*;

Comparar e associar os resultados imunológicos e moleculares obtidos dos indivíduos com e sem história de tuberculose.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos Gerais

A Tuberculose (TB) é um problema de saúde pública em todo o mundo e a principal causa de morte por um agente infeccioso. Cerca de 5% - 10% das pessoas infectadas progressam para a tuberculose primária. A maioria dos indivíduos controla a infecção, são assintomáticos, e têm infecção latente. A cada segundo uma pessoa no mundo é infectada com o bacilo da TB e uma pessoa com TB ativa não tratada, infecta em média 10 a 15 pessoas a cada ano (WHO, 2011). A Organização Mundial de Saúde está trabalhando para reduzir drasticamente os casos de TB, e reduzir pela metade as mortes por tuberculose e prevalência até 2015, através da sua Estratégia Stop. O Plano Global do Stop TB é uma avaliação global da ação e conta com recursos necessários para implementar a estratégia “Travar a Tuberculose” e gerar um impacto sobre a carga global da TB (WHO, 2012).

No Brasil, suas taxas de incidência permanecem altas nas duas últimas décadas e estima-se a existência de mais de 42 milhões de infectados, além de a doença ter levado à ocorrência de cerca de 112.000 óbitos no período de 1999 a 2010 (SOUZA et al, 2005). A doença acomete, principalmente, pessoas na faixa etária produtiva (17-49 anos) e alcança os setores de mais baixa renda da população. O Estado de Pernambuco chegou a registrar uma média de 4,5 mil novos casos de TB por ano e tem a terceira maior taxa de incidência no Brasil. O maior número de registros de TB vem sendo contabilizado nos municípios da região metropolitana. Atualmente, a taxa de incidência da TB no Estado de Pernambuco é de 46/ 100.000 habitantes (BRASIL, 2010). No

município do Cabo de Santo Agostinho no ano de 2011 foram confirmados 107 casos novos de tuberculose (SINAN, 2012). Este município tem um coeficiente de incidência de aproximadamente 60 casos novos por 100.000 habitantes e apresenta uma incidência acima da média nacional.

Um fato histórico que se pode apontar como responsável pelas mudanças de direção das curvas de prevalência da TB foi à pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Após a infecção pelo vírus HIV, pessoas com história de exposição à TB no passado passaram a adoecer por tuberculose. Com isso, a prevalência da TB aumentou, sendo considerada uma doença novamente em ascensão (SILVA e BOÉCHAT, 2004). Uma pessoa portadora do vírus HIV tem um risco maior de desenvolver tuberculose e, em sendo bacilífera, de transmitir o bacilo para pessoas que não estão infectadas pelo vírus HIV.

A TB é causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno intracelular facultativo. O agente infeccioso da tuberculose foi descoberto em 1882 por Robert Koch, que isolou e descreveu o bacilo, conseguindo seu cultivo e reproduzindo a doença em animais. Outras espécies como *M. bovis* e alguns patógenos oportunistas do complexo *M. avium-intracellulare* também podem causar a doença, porém com menor freqüência (KRISTSKI et al., 2000).

O gênero *Mycobacterium* apresenta mais de 100 espécies conhecidas (ARNOLD, 2006), com ampla distribuição geográfica, diversidade de habitats e variadas relações com outros organismos, incluindo mais de 20 espécies com variados graus de patogenicidade para o homem (SATO, 1999). Os bacilos que

causam a tuberculose estão agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por: *M. tuberculosis*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. africanum* e *M. microti*, além da cepa vacinal *M. bovis* BCG.

O *M. tuberculosis*, é uma bactéria da ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium*. São bastonetes delgados aeróbicos obrigatórios. Crescem lentamente, algumas vezes formam filamentos e tendem a crescer em cachos. Na superfície de um meio líquido, seu crescimento parece ter a forma de um bolor, o que sugeriu o nome do gênero *Mycobacterium* (*myco*= fungo) (TORTORA, 2012).

A parede do bacilo de Koch é formada por 3 camadas (lipoprotéica, polissacarídica e mucopeptídica) e cerca de 60% do seu peso é constituído de lipídeos compostos por ácidos graxos (micólico) e ésteres de álcool. A integração entre os seus diversos componentes confere ao bacilo resistência aos processos de fagocitose do hospedeiro, permite a sua viabilidade no interior de fagócitos, diminui a velocidade de trocas entre os meios interno e externo do bacilo, confere resistência a antissépticos, hidróxido de alumínio, ácido sulfúrico e a vários antibióticos (TRABULSI, 2008).

A tuberculose primária ocorre após a transmissão do bacilo por um paciente bacilífero e sua manifestação clínica depende do estado de nutrição, presença de outras infecções e competência imunológica do indivíduo infectado. Normalmente é uma doença moderada, autolimitada em cerca de 97% dos casos. A tuberculose secundária é causada pela reativação dos microrganismos que persistiram no organismo em estado de dormência. Nesses indivíduos, as bactérias latentes presentes nos tecidos emergem anos

ou décadas depois. O dano decorrente dessas infecções deve-se, em menor proporção, aos efeitos diretos das bactérias nos tecidos do hospedeiro e em grande parte às reações de hipersensibilidade do hospedeiro agora sensível aos produtos das bactérias (SCHAECHTER, 2002).

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde classificou a TB em doença reemergente. Ao longo da sua história a TB vem mantendo uma ligação íntima com a humanidade e nos últimos 30 anos ressurgiu como uma das doenças mais prevalentes, particularmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2011).

No final da década de 90, o diagnóstico dos casos novos de TB no Brasil deveria ser feito ambulatorialmente, graças ao Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose em 1999. O mesmo introduzia o tratamento supervisionado e mudanças para uma administração gerencial. Entretanto, isto não ocorreu nas grandes metrópoles (REDE TB, 2011).

A ausência da busca ativa de casos nas emergências, aumenta o risco de transmissão da TB em nível intra-hospitalar devido ao retardo no diagnóstico e no início do tratamento adequado. Além disso, em nosso meio, mesmo com a disponibilização de tratamento anti-retroviral de elevada eficácia para os pacientes HIV positivos, a grande maioria dos casos de óbitos associados a TB e/ou TB/HIV ocorre em hospitais de grandes metrópoles, locais sem ações coordenadas de controle de TB e TB/HIV (SELIG, 2010). Apenas recentemente, a transmissão da TB em hospitais, prisões, albergues passou a ser considerada uma realidade em nosso meio (REDE TB, 2011).

O diagnóstico precoce é uma das prioridades do programa de controle da TB dada a sua importância na quebra da cadeia de transmissão da doença. No âmbito da saúde pública, a baciloscopia é o exame de escolha, pelo baixo custo, simplicidade técnica e tempo de execução; embora já estejam disponíveis no mercado métodos de cultivo automatizado em meio líquido e métodos moleculares (BRASIL, 2004).

O tratamento da TB é outra prioridade do programa de controle da TB, e no Brasil é gratuito. Apesar do esquema terapêutico adotado pelo Ministério da Saúde ser capaz de curar quase a totalidade dos casos, o uso inadequado da medicação durante o tratamento e o abandono têm possibilitado a seleção de bacilos resistentes (BALIZA et al., 2008).

3.2. Aspectos Imunológicos

O *M. tuberculosis* é capaz de sobreviver e de replicar-se no interior das células do hospedeiro, inclusive fagócitos, por apresentar mecanismos de resistência à degradação lisossômica. As micobactérias utilizam importantes mecanismos para sobrevivência intracelular, depois de ingeridos pelos macrófagos, tais como: inibição da fusão do fagossoma-lisossoma (fagolisossoma); inibição da acidificação do fagossomo; resistência aos produtos oxidantes dos metabólitos celulares do oxigênio e óxido nítrico (CLEMENTS & HORWITZ, 1995). O resultado da fagocitose, lise da micobactéria ou seu escape do arsenal lítico da célula fagocitária, é que

determina a evolução clínica, tuberculose-infecção ou tuberculose-doença, respectivamente (FENTON & VERMEULEN, 1996).

Uma série de outros elementos celulares participa da resposta anti-*M. tuberculosis*. Desempenham papel fundamental os linfócitos TCD4+, que exercem importante atividade reguladora da função de macrófagos. A função efetora para a eliminação bacteriana é mediada por macrófagos que são ativados por citocinas derivadas dos linfócitos T, particularmente o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (RAJA, 2004; WINSLOW et al., 2003; ANDERSEN e SMEDEGAARD, 2000; WU et al., 2002).

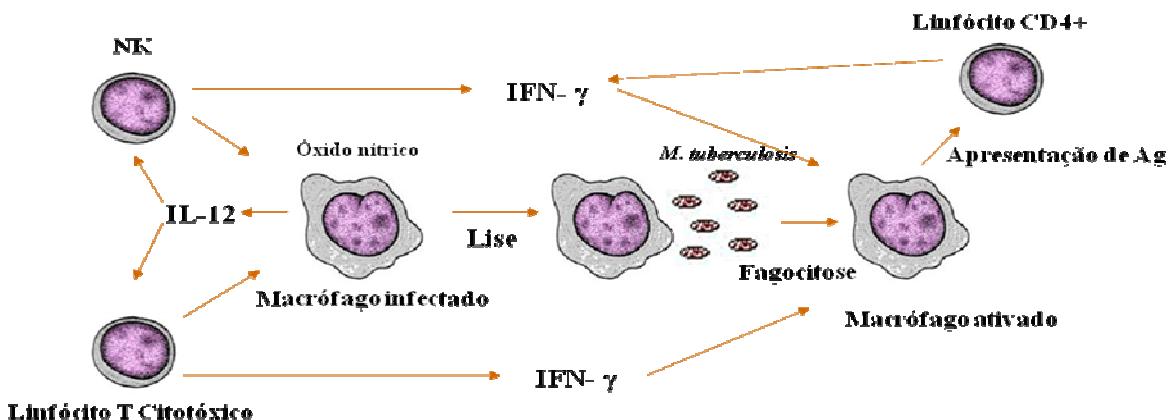
Os macrófagos são as principais células da imunidade inata para diferentes infecções por micobactérias, incluindo a tuberculose humana causada por *M. tuberculosis*. As funções dos macrófagos após infecção por micobactérias são estritamente dependente do fenótipo de sua ativação, que é determinado pela sinalização através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRS), levando à ativação da célula inata, e também é regulada por uma variedade de sinais a partir do microambiente circundante. O mais importante destes sinais são citocinas produzidas por linfócitos ativados e outras células (ANDRADE et al., 2012).

Pesquisas têm admitido que macrófagos ativados podem matar o *M. tuberculosis* e que monócitos humanos podem ser ativados para uma alta atividade microbicida através do tratamento com citocinas tais como IFN- γ e TNF- α (DENIS, 1991, SILVER et al., 1998; FLYNN & ERNEST, 2000). Os fagócitos de uma forma geral são ativados por essas citocinas, gerando óxido nítrico (NO) e assim iniciam a via dos RNI (Reativos Intermediários do

Nitrogênio). A grande importância destas substâncias tóxicas na defesa contra o *M. tuberculosis* tem sido bem documentada tanto *in vitro* como *in vivo* (LEE et al., 2011; RAHMAN et al., 2009; RAJA, 2004).

Na tuberculose, já foi identificada uma participação efetiva e coordenada de diversas citocinas tais como as interleucinas-12 (IL-12), IL-23, IL-27, IL-18, IL-1, IL-7 e IL-15 (TOMIOKA et al., 2011).

Embora um grande espectro de citocinas possa contribuir para proteção, a resposta tipo 1 é dominada pela secreção de IFN- γ , que é considerado o principal mediador da proteção imunológica contra TB (FLYNN, 2004). Por outro lado, o TNF- α , principalmente secretado pelos macrófagos, contribui para ação antituberculose e limita a patologia da doença (POVEDA et al., 1999; MOHAN et al., 2001) (Figura 1). A resposta tipo 2, caracterizada pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, está associada com uma baixa de proteção (BAI et al., 2004; FLYNN, 2004). Em particular, a citocina antinflamatória IL-10 está associada com a redução da resistência e TB crônica progressiva (SIELING et al., 1993; TURNER et al., 2002). A IL-10 desativa macrófagos e diminui a regulação e secreção de citocinas tipo 1 (TURNER et al., 2002). Por isso, diferentes perfis de citocinas podem possivelmente determinar se a tuberculose está em resolução, progresso ou tornou-se latente (BAI et al., 2004).

Figura 1. Resposta protetora inicial ao *M. tuberculosis*.

Um aspecto importante na avaliação imune do hospedeiro frente à infecção pelo *M. tuberculosis* é o desenvolvimento de respostas do perfil Th2. Infecções intestinais causadas por helmintos são referidas por induzir uma imunidade tipo Th2 no hospedeiro e as evidências sugerem que a resposta imune Th2 pode desempenhar um papel crucial na redução da gravidade da doença aguda após infecção helmíntica. A resposta imune do hospedeiro a infecção por parasitas se correlaciona com a produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e, consequentemente, a grande produção Imunoglobulina E (IgE) e forte eosinofilia (ANDREW et al., 2002). Estudos têm indicado que a resposta humoral a parasitas favorece a infecção por *M. tuberculosis* e que os indivíduos infectados por helmintos podem estar em risco de desenvolver a doença ativa (BORKOW et al., 2001).

As infecções parasitárias e a tuberculose compartilham índices epidemiológicos semelhantes em várias regiões do mundo. A imunomodulação induzida pelo perfil Th2 nas infecções helmíticas pode diminuir o desenvolvimento de uma resposta eficiente Th1 após a infecção pelo *M. tuberculosis*, que pode favorecer da infecção e consequente desenvolvimento

da doença. À medida que a imunidade mediada por células é influenciada pelo estado nutricional do hospedeiro, o efeito negativo das infecções helmínticas na imunidade mediada por células contra o *M. tuberculosis* pode ser parcialmente explicado pela desnutrição acompanhada das infecções helmínticas (VERHAGEN et al., 2012).

Estudos demonstram que infecções helmínticas induzem a diminuição de mecanismos efetores Th1 anti-*M. tuberculosis* e destacam a idéia que esses parasitas induzem os macrófagos ativados a uma diminuição na modulação dos mecanismos de defesa anti-micobactéria nos sítios pulmonares da infecção (VERHAGEN et al., 2012). Helmintos induzem uma forte resposta Th2 no hospedeiro, resposta essa que promove a secreção de muco, a deposição de colágeno e a cicatrização de feridas, esses mecanismos são críticos para a expulsão dos vermes. Apesar da resposta protetora Th2, os helmintos são capazes de persistir no hospedeiro por um longo período de tempo, resultando numa infecção crônica (ALLEN & MAIZELS, 2011).

Na verdade, observa-se que durante a infecção por helmintos, há uma expansão de populações Tregs que produzem TGF-β e IL-10 (BABU et al., 2006; INCE et al., 2006). As citocinas geradas durante a resposta Th2 são inibidores potentes da resposta Th1, particularmente IL-4, IL-10 e TGF-β. Em seres humanos a reativação da tuberculose latente está associada com a produção aumentada de IL-10 e TGF-β por monócitos circulantes e, possivelmente, Tregs, que suprimem a produção de citocinas Th1 (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006). Infecções concomitantes por helmintos intestinais em pacientes com tuberculose foi demonstrado alterações nas populações de

células T, associadas com baixos níveis de IFN- γ (RESENDE et al., 2007). No entanto, foi observado que o tratamento com drogas anti-helmínticas restaura as respostas Th1, sugerindo que os efeitos imunomoduladores induzidos por helmintos são transitórios (BABU et al., 2009).

Muitos dos eventos mediados por citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL10 são importantes para o estabelecimento da imunidade contra o MTB e a expressão da resistência do hospedeiro (GUPTA et al., 2012).

Interferon gama (IFN- γ)

Os interferons (IFNs) são substâncias originalmente identificadas em sobrenadantes de culturas celulares infectadas por vírus e que pareciam interferir diretamente na replicação viral, daí sua denominação (ISAACS e LINDENMANN, 1957). Divididos em dois tipos principais, os IFNs do tipo I são induzidos e agem efetivamente em respostas contra vírus: o IFN- α é secretado em grande parte por leucócitos, e o IFN- β é produzido por fibroblastos. Interferon do Tipo II, agora designado como IFN- γ , é sintetizado principalmente por linfócitos T e células NK após a ativação destas células com estímulos imunes e inflamatórios, em vez de infecção viral (SCHREIBER e SCHREIBER, 2003).

O IFN- γ é a principal citocina envolvida na resposta imune protetora contra a infecção causada por micobactérias. Ela é produzida primariamente por linfócitos T CD4+, CD8+ e células NK. Sabe-se também que células T Natural Killer (NKT) e linfócitos T $\gamma\delta$, células com repertórios restritos de

reconhecimento antigênico, também podem produzir IFN- γ em resposta à estimulação micobacteriana, exibindo proteção contra a infecção por *M. tuberculosis* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (COOPER & KHADER, 2008).

A principal função do IFN- γ é a ativação de macrófagos, tornando-os hábeis a exercerem suas funções microbicidas. Atua também melhorando a apresentação de抗ígenos através da indução da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e II e promovendo a diferenciação dos linfócitos T CD4+ para a subpopulação Th1 (FLESH et al., 1995; FENTON et al., 1997; OBERHOLZER et al., 2000).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram a importância da produção do IFN- γ para o controle da tuberculose (TAVARES et al, 2006; NIENHAUS ET al., 2008; COSTA et al, 2010). Experimentos em camundongos mostraram que o IFN- γ é a citocina essencial para ativação dos macrófagos e para a morte da micobactéria no ambiente intracelular. COOPER et al. (1993) e FLYNN et al (1993) demonstraram que camundongos destituídos do gene de IFN- γ sofreram infecção fulminante por *M. tuberculosis*.

Indivíduos com uma deficiência genética no gene do receptor do IFN- γ demonstram serem extremamente susceptíveis a infecções micobacterianas (NEWPORT et al., 1996). A deficiência completa do receptor do IFN- γ em humanos está associada com alta gravidade no curso da infecção, pobreza na formação dos granulomas, lesões multibacilares e infecção progressiva (OTTENHOFF et al., 2005). Estudos realizados em indivíduos que apresentam mutações gênicas nos receptores para IFN- γ comprovaram também que estes

apresentavam alta susceptibilidade às infecções causadas por micobactérias atípicas (JOUANGUY et al., 1996).

O eixo IL-12/ IFN- γ é determinante para a geração de linfócitos Th1, ativação de macrófagos por células T e subsequente morte da bactéria. Uma série de mutações associadas aos componentes deste eixo foram identificadas em humanos: estas incluem mutações nos genes IL-12R β 1, IL-12p40, IFN- γ R1, IFN- γ R2, e transdutor de sinal e ativador de transcrição-1 (STAT-1). A maioria das infecções associadas com estas desordens mendelianas advém do uso da BCG ou de micobactérias ambientais. No entanto, alguns dos distúrbios também estão associados com suscetibilidade aumentada ao *M. tuberculosis* (IFN- γ R2 e IL-12p40) (CASANOVA & ABEL, 2002; COOKE & HILL, 2001).

Estudos relatam que pacientes com formas menos graves de tuberculose pulmonar têm uma predominância de citocinas do tipo Th1 como o IFN- γ , enquanto o aumento nos níveis de IL-4, uma citocina tipo Th2, está relacionado à severidade da doença (DLUGOVITZKY et al., 1997; DLUGOVITZKY et al., 1999). TORRES et al. (1998) estudaram a resposta imune de PBMCs de pacientes com tuberculose ativa e seus contatos intradomiciliares saudáveis em resposta ao antígeno de 30-KDa do *M. tuberculosis*. Seus resultados mostraram uma falha na produção de IFN- γ pelos pacientes em resposta ao antígeno estudado e uma forte resposta a este antígeno pelas células dos comunicantes sadios, sugerindo um papel protetor do IFN- γ nestes indivíduos.

Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF, TNF- α) foi originalmente caracterizado como um indutor de necrose em sarcomas *in vivo* (CARSWELL et al., 1975). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que exerce múltiplos efeitos biológicos. A expressão do TNF- α é rigorosamente controlada, já que sua superprodução pode mediar os efeitos nocivos encontrados no choque séptico como hipotensão arterial, coagulação vascular disseminada e hipoglicemia letal.

No processo de controle da infecção por micobactéria, o TNF- α parece ter uma participação fundamental, atuando em uma ampla variedade de células. As principais células produtoras são os macrófagos ativados, linfócitos T e células dendríticas (BARNES et al., 1994; LADEL et al., 1997; SERBINA et al., 1999). Esta citocina atua em sinergismo com o IFN- γ , estimulando a produção de reativos intermediários de nitrogênio (RNI), mediando assim, a ação tuberculostática dos macrófagos (YU et al., 1999; SCANGA et al., 2000). O TNF- α também estimula a migração de células imunes para o foco da infecção, contribuindo para a formação do granuloma capaz de controlar a progressão da doença (MOHRAN et al., 2001).

O bloqueio do TNF- α tem efeitos dramáticos na evolução da tuberculose em modelos experimentais. A neutralização do TNF- α em modelos murinos resulta em agravamento da tuberculose ou na sua reativação (MOHAN et al., 2001). A deleção do gene do TNF- α ou de seu receptor resulta em granulomas aberrantes ou tuberculose aguda fulminante (FLYNN et al., 1995; BEAN et al.,

1999). Estudos também revelaram que o TNF- α é expresso em tecidos infectados pelo MTB durante toda a fase latente da infecção (FLYNN et al, 1998), sugerindo uma contribuição, junto com outras citocinas como o IFN- γ , no controle da multiplicação do bacilo.

Níveis elevados de TNF- α comumente são detectados em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com tuberculose pulmonar estimuladas com antígenos micobacterianos (DLUGOV TZKY et al, 2000; WANG et al, 2001; AL-ATTIYAH et al, 2012). MOURA (2002) avaliando a resposta celular de pacientes antes e após o tratamento observou que os pacientes com tuberculose pulmonar ativa produziram TNF- α em níveis elevados, porém não observou diferença significativa nos níveis desta citocina após o tratamento e concluiu que estes resultados reforçam o papel desta citocina tanto na fisiopatologia da doença quanto na imunidade protetora.

Um estudo recente investigou o papel que o NOD2 (nucleótido de ligação de receptor de domínio 2) desempenha nas respostas inatas dos macrófagos alveolares humanos e mostrou que quantidades significativas de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram produzidas após o reconhecimento do ligante com o muramildipeptideo (MDP). O tratamento de macrófagos alveolares com MDP melhorou o controle do crescimento intracelular do *M. tuberculosis*, ação associada com uma significativa produção de TNF- α e IL-6 (JUAREZ et al., 2012).

Talvez, uma das evidências mais contundentes dos efeitos protetores do TNF- α no combate ao *M. tuberculosis* advinha da observação de que pacientes com artrite reumatóide sob tratamento com antagonistas do TNF- α (anticorpos monoclonais contra o TNF- α ou receptores solúveis de TNF- α) possuem risco significativamente elevado de reativar TB latente (MAINI et al., 1999; SOLOVIC et al., 2010; STALLMACH et al., 2010).

Por outro lado, também há evidências mostrando que o TNF- α pode estar associado com respostas imunopatológicas na tuberculose, já citado inclusive como o principal mediador da destruição do tecido pulmonar (FLYNN et al., 2001). Níveis elevados de TNF- α estão relacionados com inflamação excessiva com necrose e caquexia (BEKKER et al., 2000; EHLERS et al., 2001).

Interleucina 10 (IL-10)

Devido à sua capacidade de inibir a produção de citocinas produzidas por linfócitos T, a IL-10 foi originalmente descrita como fator inibidor da síntese de citocinas (CSIF) (FIORENTINO et al., 1989). Estudos subsequentes demonstraram que a IL-10 poderia também inibir *in vitro* subpopulações Th1 e Th2 (DE WAAL MALEFYT et al., 1993; SCHANDENE et al., 1994). A IL-10 atua inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-12) e atuação das células apresentadoras de抗ígenos, bloqueando a ativação de linfócitos T através da inibição da expressão de moléculas MHC II (FULTON et

al., 1998; FLYNN et al., 2001). Apresenta, portanto, uma função imunorreguladora (D'ANDREA et al., 1993).

A IL-10 é produzida por macrófagos e linfócitos T durante a infecção causada pelo *M. tuberculosis*. Ao contrário do TNF- α e IFN- γ , a IL-10 é considerada primariamente uma citocina inibitória, importante para o equilíbrio adequado entre respostas inflamatórias e imunopatológicas. No entanto, o aumento dos níveis de IL-10 parece favorecer a sobrevivência da micobactéria no hospedeiro. Camundongos com deficiência de IL-10 apresentam imunidade antimicobacteriana aumentada (MURRAY & YOUNG, 1999). A IL-10 reduz a resposta protetora para o MTB na cepa de camundongo CBA em que a IL-10 é produzida pelos fagócitos no interior da lesão pulmonar, observando-se redução na expressão de TNF e IL-12p40 (BEAMER et al., 2008). A IL-10 também é hábil em induzir a reativação da tuberculose em animais (HENAO et al., 2006).

A IL-10 está elevada em amostras obtidas de pacientes com TB, e uma maior capacidade de produzir IL-10 está associada com aumento da incidência de doença. Na tuberculose humana, a produção de IL-10 é maior em pacientes anérgicos, sugerindo que o *M. tuberculosis* induz a produção de IL-10 suprimindo uma resposta imune efetiva (BOUSSIOTIS et al., 2000). Macrófagos de pacientes com tuberculose são suprimidos *in vitro* e a inibição da IL-10 reverte parcialmente esta supressão (FLYNN & CHAN, 2001). Em outro estudo, a IL-10 foi capaz de inibir diretamente as respostas de linfócitos T CD4+ de doadores com TB latente, bem como reduzir a expressão de MHC

classe I, MHC classe II, CD40, B7-1, e B7-2 de monócitos infectados com MTB (ROJAS et al., 1999).

Diminuir a resposta celular protetora é objetivo do *M. tuberculosis* para sobrevivência no hospedeiro. IL-10 e outros mediadores inibitórios da resposta inflamatória (TGF-βRII, IL-1Rn(Antagonista do receptor da IL-1) são observados no escarro de pacientes com TB, trinta dias após tratamento, o nível destes diminui sensivelmente, enquanto se observa um aumento da resposta Th1 (ALMEIDA et al., 2009).

A análise dos polimorfismos do gene da IL-10 envolvidos no desenvolvimento de doenças infecciosas sugere que este polimorfismo tem um papel crítico na imunidade e no progresso da inflamação. Em particular, o aumento da produção de IL-10 pode suprimir a resposta imune e promover o progresso da doença (SHIN et al., 2005).

Em relação a imunopatogenia da TB, é indiscutível o papel imunossupressor representado pela IL-10 (PEREIRA et al., 2004; AWOMOYI et al., 2002). Ainda assim, alguns estudos não detectaram níveis aumentados desta citocina em PBMCs de pacientes com TB ativa, em resposta a抗ígenos micobacterianos (McDYER et al., 1997).

Outras citocinas envolvidas na Tuberculose

Embora saiba-se que as citocinas IFN-γ e TNF-α do perfil Th1 foram identificadas como os agentes mais importantes da cascata de citocinas antimicobacteriana devido à formação, bem como a manutenção do granuloma

mediadas por TNF- α em sinergia com IFN- γ na ativação de macrófagos para a produção de moléculas efetoras (LIN & FLYNN, 2010), outras citocinas, incluindo a interleucina IL-12, IL-17 e IL-23, contribuem para a resposta do hospedeiro à micobactéria, melhorando o desenvolvimento das células Th1 (KHADER et al., 2007).

Recentemente, uma nova população de células foi identificada e denominada Th17. Essas células produzem a IL-17, IL-21 e IL-22 (HARRINGTON et al., 2005; PARK et al., 2005). O receptor para IL-17 é expresso em diferentes tipos órgãos, incluindo o fígado, pulmão e baço, e diferentes tipos de células são capazes de responder a IL-17, tais como células dendríticas, macrófagos, linfócitos, células epiteliais e fibroblastos. Entre as respostas induzidas pela IL-17 incluímos a expressão de genes pró-inflamatórios, quimiocinas, IL-6, IL-8, proteínas antimicrobianas. Dados recentes sugerem um maior e mais complexo papel para estas células e citocinas produzidas por elas em diferentes infecções intracelulares, incluindo bactérias, fungos e vírus em diferentes superfícies mucosas (KADER et al., 2009). Portanto, o equilíbrio entre a proteção e patologia mediadas por células Th17 é a chave na definição do resultado de infecções na mucosa (TORRADO and COOPER, 2010).

Células Th17 também participam da resposta inflamatória precoce na infecção micobacteriana; no entanto, a produção de IL-17 nos pulmões age principalmente inibindo a ação de IFN- γ . O potencial protetor das células Th17 durante a fase precoce da infecção por *M. tuberculosis* é desconhecida (WOZNIAK et al., 2010). Há evidências sobre o papel da IL-17 durante as

infecções micobacterianas. A infecção pulmonar com BCG ou *M. tuberculosis* estimulou a secreção precoce de IL-17 de 1 a 14 dias respectivamente e em sequencia o desenvolvimento de células T secretoras de IFN- γ . Durante a infecção pulmonar por BCG camundongos deficientes na produção da IL-17 mostraram uma redução nas respostas de hipersensibilidade retardada com deficiência na formação de granulomas nos pulmões, sugerindo que a IL-17 é necessária para o desenvolvimento das respostas Th1 eficientes (WOZNIAK et al., 2010).

A secreção da IL-23 é essencial para a secreção da IL-17, pessoas com deficiência do gene IL-12R β 1 possuem baixa capacidade de produzir IL-23 e a produção do IFN- γ é menor. A IL-12 reduz a expressão da IL-17 e isto parece demonstrar uma autorregulação da inflamação. O equilíbrio entre a secreção de IL-23/IL-17 e IL-12/IFN- γ parece ser essencial para a regulação da inflamação em resposta ao *M. tuberculosis* e outras micobactérias (MOUTINHO, 2011).

Outras citocinas importantes na resposta ao *M. tuberculosis* estão sendo estudadas. Entre as citocinas inflamatórias, destaca-se a interleucina-1 que é necessária para o controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, mas o papel dos seus dois ligantes, IL-1 α e IL-1 β , e sua regulação *in vivo* são pouco compreendidos. Uma característica importante da IL-1 é o seu controle na transcrição, organizando os níveis de transcrição e transdução de sinal, que são evidenciadas pela grande variedade de imunopatologias e doenças autoinflamatórias que ocorrem na ausência da regulação da IL-1 (DINARELLO, 2009, 2010; GARLANDA et al, 2007). Pouco se sabe também sobre a

expressão e processamento de IL-1, no contexto da infecção por *M. tuberculosis* in vivo. As populações de células que produzem IL-1 durante a infecção ainda não foram caracterizados (KATRIN et al., 2011)

GULER e colaboradores (2011) investigaram o papel da IL-1 α e IL-1 β durante a infecção crônica pelo *M. tuberculosis* e reativação espontânea em ratos. O bloqueio de IL-1 α , mas não de IL-1 β resultou em aumento da susceptibilidade a infecção crônica com o *M. tuberculosis*. Neutralizando ou IL-1 α ou IL-1 β isoladamente não houve aumento de reativação da tuberculose latente. A geração de anticorpos neutralizantes IL-1 α e IL-1 β simultaneamente, não influenciaram o ganho de peso durante a reativação e observaram um ligeiro aumento na contagem de bacilos pulmonares quando comparados ao grupo-controle imunizados. Assim, os resultados sugerem que a IL-1 α é o principal mediador da IL-1RI-dependentes e de respostas imunes inatas protetoras ao *M. tuberculosis* em camundongos.

Em estudo recente o papel da IL-1 na resistência do hospedeiro foi demonstrado através da indução de anticorpos contra a citocina que resultou em aumento da mortalidade durante a infecção crônica (GULER et al., 2011).

Óxido Nítrico (NO)

Outro aspecto importante na infecção pelo MTB é a ativação dos macrófagos em resposta aos sinais das citocinas proinflamatórias, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia-Granulócito Macrófago) produzidas pelas células Th1 e NK (GUPTA et al., 2012). Os macrófagos são ativados por

essas células e também pelos próprios macrófagos ativados, desenvolvendo os mecanismos imunológicos cruciais para a eliminação da micobactéria nos sítios de infecção como a produção de reativos intermediários do nitrogênio (RNI) e oxigênio (NO) (COOPER, 2008; LIN & FLYNN, 2010).

O Óxido Nítrico (NO) pode contribuir para morbidade da infecção agindo como um vasodilatador e mediador citotóxico. Por outro lado, propriedades microvasculares, citoprotetora, imunoregulatória e antimicrobiana do NO tem um papel importante no hospedeiro infectado (FANG, 1997).

A atividade antimicrobiana do NO tem sido demonstrada por evidências circunstanciais que implicam a produção do NO como parte de uma efetiva resposta do hospedeiro. A produção de NO induzida pela isoforma NOS2 é estimulada pelas citocinas proinflamatórias tais como IFN- γ , TNF- α , IL-1, e IL-2, bem como produtos antimicrobianos com o lipopolissacarídeo e o ácido teicóico. O aumento da expressão de NOS2 e do NO produzido pode ser demonstrado nos sítios de infecção em humanos com tuberculose (NICHOLSON et al., 1996).

Wang et al. (1997) demonstraram que a magnitude da produção de iNOS está aumentada em ambos macrófagos alveolares e monócitos de sangue periférico de pacientes TB comparando essas células com as de indivíduos normais.

Diferentes espécies de *Mycobacterium* demonstram variações na susceptibilidade ao NO e seus reativos intermediários. Por exemplo, estudos relatam que o crescimento intracelular de *M. bovis* e *M. tuberculosis* é inibido

pelos reativos intermediários do nitrogênio gerados pelos macrófagos derivados de monócitos humanos. Por outro lado, macrófagos foram infectados com *M. avium* e foram estimulados com IFN- γ , TNF- α e fator estimulador de colônia granulócito-macrófago na presença e na ausência de L-arginina. Nesse experimento nenhuma inibição competitiva pelo L-arginina teve nenhum efeito na inibição do crescimento do *M. avium* (DENIS, 1991).

Devido à relação próxima entre as células Th1 e o óxido nítrico na doença, é provável que exista um mecanismo regulatório recíproco entre eles. Niedbala et al. (2007) mostraram que o óxido nítrico realça o efeito seletivo na indução e diferenciação das células Th1, mas não das células Th2. O efeito do NO é pela ação direta nas células T, mas em sinergia com IL-12 produzida pelas células apresentadoras de antígeno. Em estudo anterior, demonstraram que altas doses de NO são citotóxicas, enquanto que baixas doses de NO encaminha seletivamente a diferenciação de células Th1 murina, mas não as células Th2.

Jonna e colaboradores (2012) avaliaram materiais de escarro de pacientes positivos com tuberculose pulmonar em Gondar, Etiópia. Investigaram o perfil de suscetibilidade de drogas, e concluíram que existe uma correlação entre a resistência de primeira linha anti-tuberculose e a redução da produção de NO em amostras clínicas de *M. tuberculosis* (JONNA et al., 2012).

Embora o NO e o H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) desempenhem um papel no controle da infecção por *M. tuberculosis*, não está completamente entendida sobre a forma como as bactérias transcripcionalmente respondem a diferentes concentrações destes dois produtos. MARTIN et al (2011) estudaram efeitos dependentes de várias concentrações ROS e RNS (espécies reativas do

oxigênio e nitrogênio) no crescimento e sobrevivência do *M. tuberculosis* e determinaram a resposta transcricional de *M. tuberculosis* de H₂O₂ e NO nestas mesmas doses. Os resultados demonstraram a expressão de vários genes de defesa do estresse oxidativo, sugerindo que os bacilos são continuamente preparados para a defesa desses produtos celulares anti-tuberculose (MARTIN et al., 2011).

Fator de Transcrição FoxP3

Atualmente um aspecto importante nas respostas imunológicas associado com o desenvolvimento de doenças infecciosas é o estudo de células T regulatórias. As células T CD4 regulatórias (Células Treg) desempenham um papel no controle do sistema imune. Várias populações de células Treg têm demonstrado um papel durante a infecção. Populações de células Th1 e Th2 podem regular uma a outra através da sua produção de citocinas. Naturalmente, células Treg podem limitar respostas Th1 e Th2, quer indiretamente através da modulação das funções de células apresentadoras de antígeno (APC) ou diretamente pelo contato célula-célula (BELKAID, 2007).

Trabalhos têm mostrado que células Treg estão aumentadas no sangue e nos sítios da doença em pacientes com tuberculose (RIBEIRO et al., 2006; HOUGARDY et al., 2007). Nestes estudos, um percentual altamente significante de células T CD4⁺CD25⁺ e altos níveis de IL-10 e TGF-β foram detectados em pacientes TB comparados aos controles saudáveis. Estudos *in vitro* mostraram a depleção de células CD25+ em pacientes com TB ativa com diminuição da produção de IFN-γ *M. tuberculosis* específico, sugerindo que

células Treg suprimem a resposta específica para o controle da infecção (RIBEIRO et al., 2006).

Green et al (2010) estudando macacos como animais modelos para infecção com *M. tuberculosis*, observaram em toda a população estudada, a diminuição na freqüência de células CD4+FoxP3+ em sangue periférico e que simultaneamente houve aumento dessas células nas vias aéreas. Animais com infecção latente apresentaram uma significante elevação na freqüência de células em sangue periférico antes da infecção e durante o inicio da infecção, quando comparados com animais que desenvolveram a doença ativa. Os dados sugerem que o aumento na freqüência das células Treg na doença ativa ocorre em resposta ao aumento da inflamação que age como um fator causador do progresso da doença ativa.

Um dos mais bem caracterizados marcadores das células Treg é o fator de transcrição Foxp3, o qual controla o desenvolvimento e função dessas células. O Foxp3 interage com o fator de transcrição NFAT impedindo a interação NFAT-AP-1 (Fator Nuclear das Células T Ativadas). Uma falha nesta interação interrompe o aumento da expressão do gene CTLA4 e CD25, dessa maneira NFAT é considerado um regulador positivo da função das Treg (WU et al., 2006).

A importância de Foxp3 nas células Tregs foi estabelecida ao se identificar a mutação do tipo *frameshift* no gene FoxP3. Esta mutação é responsável pelo fenótipo de camundongos *scurfy*, uma linhagem mutante recessiva, ligada ao X que apresenta distúrbios auto-imunes graves com depleção completa de Tregs e óbito precoce (TORGERSON & OCHS, 2007).

O gene Foxp3 humano está localizado no braço curto do cromossomo X, consiste de 11 exons e codifica uma proteína de 431 aminoácido, também denominada FOXP3. É expresso predominantemente nas células do timo, baço e linfonodos e particularmente nas células T CD4+ CD25+ (YAGI et al., 2004). A proteína FOXP3 é um fator de transcrição, que tem a função de aumentar ou suprimir a transcrição de genes específicos. Acredita-se que o fator FoxP3 exerça funções efetora e facilitadora sobre os genes de proteínas chaves na ativação celular, incluindo a IL-2 e o GM-CSF (TORGERSON & OCHS, 2007).

A sinalização nuclear pelo FoxP3 nas Tregs ainda não está bem definida. Estudos demonstram que após a ligação do antígeno com o TCR (receptor de Célula T), há uma diminuição na sinalização celular devido a interação física dos fatores nucleares NF-κB e NFAT com o fator Foxp3, reprimindo os genes de transcrição das citocina IL-2, IL-4 e IFN-γ (KUCZMA et al., 2009) Outra hipótese seria a atuação do FOXP3 na ativação de um co-fator que teria a função de liberar sinais inibitórios após a ligação do TCR com o antígeno (CAMPBELL & ZIEGLER, 2007). MARSON e colaboradores (2007) observaram que o Foxp3 liga-se a regiões reguladoras de centenas de genes em células Treg, muitos dos quais controlam as resposta das células T estimuladas por antígenos. A atividade diminuída de Foxp3 pode resultar na revogação dos mecanismos de controle molecular em células Treg e restauração das funções das células T CD4 efetoras.

O nível reduzido de expressão do Foxp3 correlacionado com a função desregulada das Tregs foi encontrado em indivíduos com doenças auto-

imunes tais como a miastenia gravis e esclerose múltipla (HUAN et al., 2005; BALANDINA et al., 2005).

A proporção de células Treg CD4+CD25+ e de mRNA de FoxP3 (Fator de transcrição FoxP3) têm sido encontrados em níveis altos em PBMCs de pacientes com TB quando comparados com os encontrados nas células dos controles saudáveis (GUYOT-REVOL et al., 2006). WU e colaboradores (2010) também observaram a proporção de células T CD4+ e CD25+ e os níveis de FoxP3 de PBMCs de pacientes com TB ativa em comparação com pacientes com infecção latente por *M. tuberculosis* e de controles negativos, concluindo que essas células podem ser consideradas como participantes nos mecanismos imunológicos regulatórios na invasão do *M. tuberculosis* desempenhando um papel principal na imunopatogênese da TB ativa.

Churina et al (2012) demonstraram a redução no número de linfócitos T com o fenótipo CD4 + CD25 + Foxp3 em todas as formas clínicas da tuberculose pulmonar (Tuberculose pulmonar disseminada, tuberculose pulmonar infiltrativa e tuberculose pulmonar fibro-cavernosa), e sugerem que é mais provável estes achados estarem ligados com o desequilíbrio da produção de citocinas e predomínio de secreção de citocinas imunossupressora, consequentemente, a inibição não só da proliferação, diferenciação, mas também da ativação de linfócitos Th1 antígeno específicos (CHURINA et al., 2012).

Um outro estudo, avaliou se as células Tregs estão aumentadas em pacientes com TB e se suprimem as respostas imunes celulares. Compararam a freqüência de células Tregs circulantes de 27 pacientes não tratados com TB

e 23 controles saudáveis utilizando dois marcadores específicos de expressão na superfície celular e expressão mRNA do FoxP3 em células mononucleares do sangue periférico. Detectaram um aumento 3 vezes maior na frequencia de células CD4+ CD25 e 2 vezes maior na expressão do FoxP3 nos pacientes com TB, existindo uma correlação positiva entre estes marcadores (GUYOT-REVOL et al., 2006).

Em alguns casos o indivíduo pode desenvolver uma forma de tuberculose pleural, e normalmente esta forma está associada a tuberculose pulmonar. Estudos sugerem que há a presença de uma polarização Th1 no fluido pleural nestes casos (OKAMOTO et al. 2005; SHARMA et al., 2002). Ativação de células Tregs, identificadas pela expressão do FOXP3, pode evitar uma excessiva resposta inflamatória e / ou pode comprometer a eliminação de *M. tuberculosis*. Estudos sugerem um aumento da presença de Tregs em tuberculose pleural (GUYOT-REVOL et al., 2006; SHARMA et al., 2009). Gaetano e colaboradores (2011) não encontraram diferenças significativas no número de células de pacientes com tuberculose pleural e expressão do Foxp3, sugerindo que pode ser um marcador de uma forte diminuição na regulação da resposta imune contra *M. tuberculosis* e que isto pode contribuir para a sua eliminação tardia (GAETANO et al., 2011).

3.3 Citocinas em comunicantes de casos de tuberculose

Contato ou Comunicante é a pessoa que convive no mesmo ambiente com o caso índice no momento do diagnóstico da TB (em casa, ambientes de

trabalho, instituições de longa permanência, escola ou pré-escola) (BRASIL, 2010).

A investigação clínica e epidemiológica do contato de portadores de tuberculose pulmonar bacilífera tem sido um dos alvos dos programas de combate e controle da tuberculose (FIÚZA DE MELLO & AFIUNE, 1995; BRASIL, 2010). No contato intradomiciliar, a freqüência e intensidade de exposição à fonte de infecção contribui para a transmissão da tuberculose, sendo a detecção de casos secundários e tratamento precoce uma das medidas de prevenção da doença (PEREIRA, 1999; BRASIL, Ministério da Saúde, 2002; CARVALHO et al., 2002; GAZETA et al., 2008).

Vários trabalhos de diferentes países têm mostrado que os contatos domiciliares de pacientes com tuberculose pulmonar ativa têm um risco maior de infecção, que varia de 30 a 80%, dependendo da intensidade de transmissão da tuberculose. A maioria dos contatos infectados de pacientes com TB apresentam a infecção e não desenvolvem a doença (AKHTAR et al., 2007; BECERRA et al., 2005; DHINGRA et al., 2004; LEMOS et al., 2004).

A identificação de indivíduos com infecção latente, onde os comunicantes podem ser incluídos, pode ser avaliada através da intradermorreação da tuberculina, o PPD: um precipitado bruto de mais de 200 antígenos de *M. tuberculosis*, comuns também ao *M. bovis*-BCG; cuja reação local determina uma resposta de hipersensibilidade tardia em indivíduos sensíveis (LALVANI et al., 2001). Em alguns países que apresentam situações semelhantes ao Brasil no aspecto epidemiológico, a taxa de positividade do teste tuberculínico pode

ser tão alta quanto 50% na comunidade e 80% nos contatos intradomiciliares exposto recentemente (TALAT et al., 2011).

Segundo o Ministério da Saúde/FUNASA (2002), considera-se uma intradermorreação positiva ao PPD quando houver uma enduração maior que 5mm nos indivíduos de alto risco (por exemplo indivíduos soropositivos para o HIV), de 10mm nos pacientes de médio risco e acima de 15 mm nos de baixo risco (LEE & HOLZMAN, 2002). Porém, a grande desvantagem do uso de PPD na identificação de indivíduos infectados é a existência de uma baixa sensibilidade da resposta por reação antigênica cruzada em indivíduos vacinados pelo BCG ou infectados por outras micobactérias que possuem proteínas análogas ao *M. tuberculosis* (HUEBNER et al., 1993). No Brasil, existe uma alta cobertura de vacinação com BCG ao nascer, e a alta prevalência do teste PPD+ na comunidade pode ser devido à vacinação prévia com BCG (DIEL et al., 2006).

Um aspecto característico na tuberculose é que sintomas respiratórios e constitucionais que se sobrepõem com os da tuberculose pulmonar são muito comuns em comunidades onde a tuberculose é endêmica. Neste cenário, o desafio é distinguir pacientes sintomáticos com tuberculose ativa de pessoas com a doença latente, mas cuja sintomatologia apresentanda é atribuível a outro processo infeccioso ou inflamatório (SANDHU et al., 2012).

Portanto, as bases para a abordagem de saúde pública frente à tuberculose são o tratamento efetivo dos doentes e a identificação dos indivíduos infectados (infecção latente). Em países desenvolvidos e que possuem baixa prevalência de tuberculose a avaliação dos comunicantes é uma prioridade do

programa, sejam eles domiciliares ou não (WHO, 2012). Lemos (2001) estudou a prevalência e risco de tuberculose em contatos domiciliares, observando que é superior ao de outros comunicantes encontrados na comunidade. Concluiu que comunicantes domiciliares de doentes com tuberculose, com bacilosscopia de escarro positiva têm uma alta prevalência de tuberculose doença e estão expostos a um alto risco de infecção. Portanto, é importante normas específicas para o controle da tuberculose, incluindo nelas o controle dos comunicantes, que é uma atividade fundamental e deve fazer parte da rotina de todas as unidades de saúde que atendem tuberculose, sobretudo, as que são referências para essa atividade (GAZETTA, 2004).

Por outro lado, alguns trabalhos avaliaram o perfil de citocinas em grupos de indivíduos comunicantes saudáveis. Entre esses trabalhos é importante citar DEMISSIE et al. (2004). Esse grupo realizou um estudo comparando a resposta imune de indivíduos saudáveis de área endêmica, caracterizados como saudáveis infectados em estágio latente, com pacientes TB. Os resultados demonstraram que os pacientes TB apresentam uma baixa regulação na expressão de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) comparados com os indivíduos com infecção latente. Isto sugere que o controle da TB no estágio latente esteja associado com, não somente a expressão aumentada das citocinas Th1, mas também com a supressão da atividade da IL-4 (DEMISSIE et al., 2004).

Reforçando esta idéia, em 2006 o mesmo grupo comparou a expressão de IL-4 e IFN- γ em sangue periférico de contatos intradomiciliares de pacientes TB com escarro positivo. Os resultados demonstraram que a expressão da IL-4

foi ligeiramente elevada nos contatos intradomiciliares comparados aos controles da comunidade. Entretanto, quando o grupo do contato intradomiciliar foi dividido em grupos com ou sem sinais imunológicos da infecção pelo *M. tuberculosis*, a expressão da IL-4 foi claramente elevada no grupo ESAT-6 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6) positivo e a expressão de citocinas Th1 como o IFN- γ foi baixa. Assim, eles sugerem que uma forte resposta ao ESAT-6 em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* tem correlação com uma baixa expressão de IFN- γ e mais elevada expressão de IL-4, e que possivelmente, este perfil está associado a um mau prognóstico para esse grupo de indivíduos.

A tabela 1 resume as principais citocinas, estudos associados com tuberculose e comunicantes no período de 1995 a 2012 com as respectivas referências.

Tabela 1- Estudos de citocinas associadas à infecção pelo *M. tuberculosis* no período de 1995 a 2012.

Citocina	Estudos na TB	Referências
TNF- α	Estudos em modelos murinos	Mohan et al., 2001; Flynn et al, 1995; Bean et al., 1999; Flynn et al., 1998; Bekker et al., 2000.
	Estudos em pacientes com Tuberculose pulmonar	Dlugovitzky et al., 2000; Al-Attiyah et al., 2012; Moura, 2002; Juarez et al., 2012.
IFN- γ	Estudos em modelos murinos	Ehlers et al., 2001; Cooper et al., 2003; Flynn et al., 1993; Sugawara et al., 1999;
	Estudos clínicos	TAVARES et al, 2006; NIENHAUS ET al., 2008; COSTA et al, 2010; DLUGOVITZKY et al., 1997; DLUGOVITZKY et al., 1999; TORRES et al. (1998; LAN et al., 2012; MOROSINI et al., 2003;

	Estudos genéticos	NEWPORT et al., 1996; OTTENHOFF et al., 2005; JOUANGUY et al., 1996; CASANOVA & ABEL, 2002; COOKE & HILL, 2001;
IL-10	Estudos murinos	MURRAY & YOUNG, 1999; BEAMER et al., 2008; HENAO et al., 2006;
	Estudos em pacientes com Tuberculose	BOUSSIOTIS et al., 2000; FLYNN & CHAN, 2001; ROJAS et al., 1999; ALMEIDA et al., 2009; WEIR et al., 2004; SHIN et al., 2005; PEREIRA et al., 2004; AWOMOYI et al., 2002; McDYER et al., 1997.
Demais Citocinas	Estudos envolvendo IL-17, IL-1, IL-23, IL-12 em TB.	Khader et al., 2007; Harrington et al., 2005; Park et al., 2005; Kader et al., 2009; Torrado and Cooper, 2010; Wozniak et al., 2010; Wozniak et al., 2010; Moutinho, 2011; Katrin et al., 2011; Guler et al ,2011;

A detecção de mediadores solúveis (citocinas e óxido nítrico) e marcadores moleculares implicados na resposta contra a micobactéria pode revelar potenciais marcadores de proteção nos indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* que apresentem as mesmas condições sócio-ambientais. Além disso, entender a participação de citocinas e de outros mediadores na resposta imune do hospedeiro humano, pode favorecer potencial aplicação imunoterápica no tratamento de pacientes TB multirresistentes a drogas e o desenvolvimento de novas vacinas.

Embora ainda não existam estudos conclusivos sobre uma clara dicotomia entre as citocinas, envolvendo imunidade protetora e susceptibilidade à doença, o estudo de comunicantes intradomiciliares de casos de TB é essencial para os programas de combate e controle da tuberculose, sendo um dos meios para o diagnóstico precoce dos casos de TB e diminuição da disseminação da doença (GAZETA et al., 2008). Portanto, o referido estudo é

de grande importância para o conhecimento de mais detalhes em relação aos indivíduos comunicantes e seus diferenciais em relação à manifestação da doença, sendo estudos desse tipo ainda muito pouco explorados.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

O presente trabalho teve como desenho um estudo transversal, onde o evento estudado é o histórico de tuberculose pulmonar doença e sua associação com a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e do óxido nítrico e o marcador molecular Foxp3. Realizamos uma amostra de conveniência a partir do estudo de uma coorte. Nos estudos transversais todas as medições são feitas num único “momento”, não existindo, portanto, período de seguimento dos indivíduos. O estudo transversal pode ser usado como um estudo analítico, ou seja, para avaliar hipóteses de associações entre exposição ou características e evento (ROUQUAYROL e ALMEIDA FILHO, 2009).

O presente estudo foi composto por dois grupos: **CTb** formado por comunicantes que tiveram TB no período de junho de 2003 a maio de 2004 e **STb** formado por comunicantes que não desenvolveram TB. Esses indivíduos foram expostos ao *M. tuberculosis*, sendo considerados comunicantes intradomiciliares de um paciente com tuberculose pulmonar. Portanto, no momento das coletas, os indivíduos estavam curados e comparou-se um grupo de comunicantes com história prévia de tuberculose pulmonar com um grupo de comunicantes sem história prévia de tuberculose pulmonar.

Vale ressaltar que os procedimentos metodológicos do presente trabalho foram condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o código de ética, resolução CNS 196/96 e

complementares. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do CPqAM e registro CAAE 0028.0.000.095-09 (anexo 1).

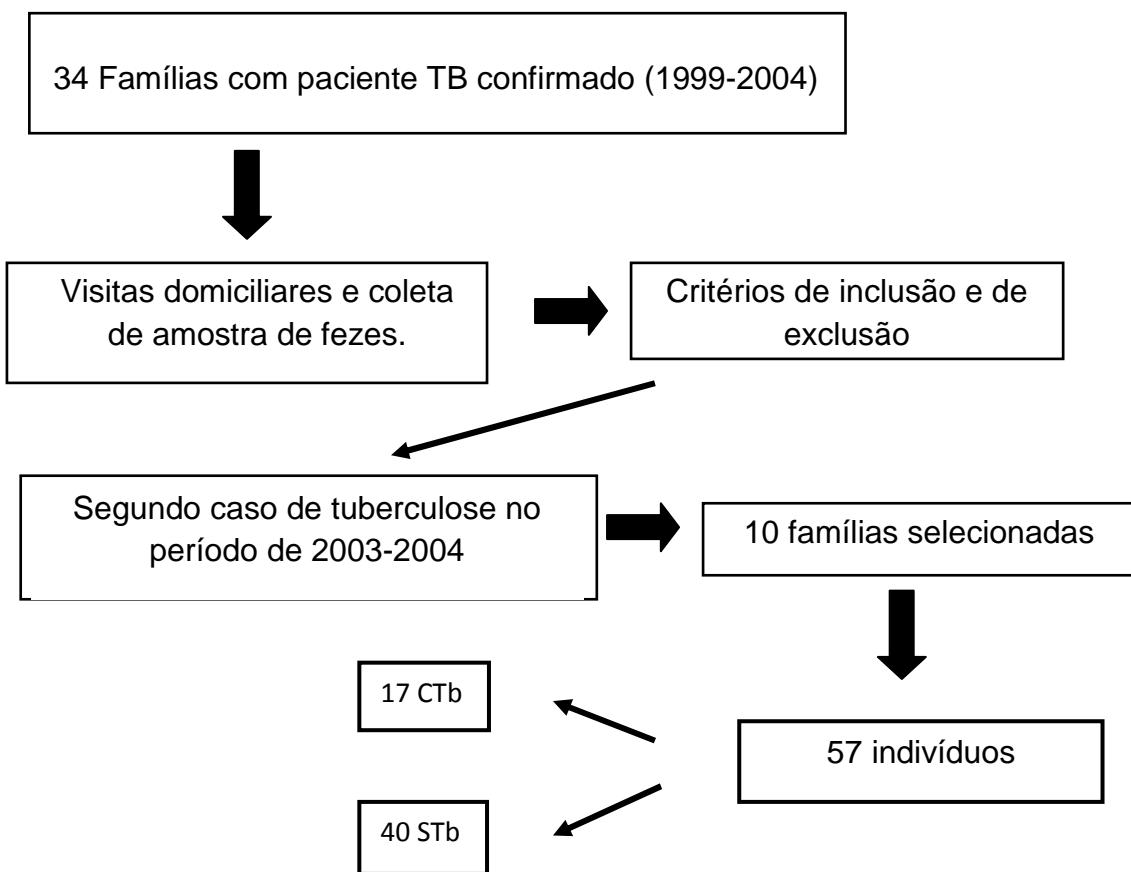
Os procedimentos para coleta de sangue iniciaram somente após o paciente concordar em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (apêndices A e B).

4.2. Seleção dos Pacientes

Os pacientes do presente estudo foram procedentes do município do Cabo de Santo Agostinho, localizado a 33,6 Km da cidade do Recife na microrregião de Suape. Foram selecionadas 34 famílias, totalizando 161 indivíduos. Inicialmente informações foram obtidas de prontuários do Centro de Saúde Herbet de Souza, referência no diagnóstico e tratamento de tuberculose no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. Todas as famílias que apresentaram no mínimo um indivíduo que teve tuberculose nos últimos cinco anos (entre o período de 1999 a 2004) foram selecionadas. Em seguida, visitas domiciliares foram realizadas a famílias que se enquadram no desenho do estudo, ou seja, existência de pelo menos um novo caso de tuberculose (CTb) entre os comunicantes que conviviam com o primeiro caso notificado no período acima citado. Indivíduos com idade inferior a 14 anos, teste sorológico positivo para o vírus HIV, diabetes entraram nos critérios de exclusão. Após essas análises dez famílias foram selecionadas. Seguida a leitura e assinatura do TCLE (apêndices A e B) foi coletada uma amostra de fezes. Entre os indivíduos foram selecionados 17 comunicantes intradomiciliares que tinham histórico

de tuberculose e 40 comunicantes intradomiciliares saudáveis sem história de tuberculose pulmonar residentes no Município do Cabo de Santo Agostinho/PE conforme fluxograma a seguir.

Figura 2 - Seleção de pacientes do presente estudo



4.3. Parasitológico de fezes

Foram analisadas 169 amostras de indivíduos distribuídos em 34 famílias, sendo coletada uma amostra de fezes de cada indivíduo. Essas amostras foram analisadas em colaboração com o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de

Pernambuco. O método empregado foi o de sedimentação espontânea preconizado por Hoffman et al., 1934. Esse método baseia-se na sedimentação espontânea em água onde há a precipitação de partículas, inclusive cistos, ovos e larvas de parasitos. Foram colocados cerca de dois gramas de fezes em um frasco de borrel com aproximadamente cinco mL de água e posteriormente triturou-se até desmanchar utilizando-se um bastão de vidro. Adicionou-se 20 mL de água e em seguida filtrou-se essa suspensão em um cálice de sedimentação com gaze, completando o volume do cálice com água.

A suspensão foi mantida em repouso cerca de 24 horas. Depois do repouso, com auxílio de uma pipeta Pasteur, recolheu-se do fundo do cálice o sedimento, depositando-o em lâmina. Adicionou-se uma gota de lugol, em seguida, cobriu-se com lamínula, observando-se ao microscópio (HOFFMAN et al., 1934).

Os indivíduos positivos para pelo menos um parasito foram tratados com 400 mg de albendazol com repetição após 21 dias.

4.4. Obtenção do antígeno total de *M. tuberculosis*

Foi utilizada uma cultura de *M. tuberculosis* inativada pelo calor, gentilmente cedida pelo Laboratório Central (LACEN).

Para obtenção do antígeno a cultura foi mergulhada em banho de gelo, macerada em homogenizador tipo potter contendo um mL de PBS. Após a maceração, seguiram-se cinco incubações de cinco minutos à 70º C alternadas

por incubações de dois minutos em banho Maria à 37º C até que a suspensão se tornou mais escura e mais viscosa.

Em seguida, a suspensão foi sonicada a 100W até que a solução ficasse completamente homogênea (10 ciclos de 30 segundos com intervalos de um minuto). Após a sonicação a solução foi centrifugada a 10.000 RPM à 4º C por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o antígeno de *M. tuberculosis* foi aliquotado e o precipitado desprezado. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford modificado (READ E NORTHCOTE, 1981). O antígeno foi aliquotado e armazenado a -80º C até o momento do uso. Para a visualização do perfil protéico, alíquotas da fração antigênica solúvel foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida segundo LAEMMLI (1970).

4.5. Obtenção de células Mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Após o tratamento com albendazol, cerca de duas semanas, novas visitas domiciliares foram realizadas e foram coletados 15 mL de sangue venoso periférico de cada indivíduo. O sangue foi coletado em tubos heparinizados (10 U/mL), e transportados até o Laboratório de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. As células polimorfonucleares foram separadas por centrifugação utilizando Ficoll-Hypaque. Após a separação, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro bovino fetal (SFB), 1% de L-glutamina e 1% de solução antibiótica (penicilina - 100UI/mL e estreptomicina -100µg/mL).

Uma alíquota de cada suspensão celular foi removida, diluída em azul de Tripa (Merck) e quantificada em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 10^6 células por mL para o ensaio de cultura de células para coleta de sobrenadantes.

4.6. Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas

As células obtidas como descrito no item 4.6 foram cultivadas em duplicata numa concentração de 10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de antibiótico (penicilina -100UI/mL e estreptomicina - 100 μ g/mL) em placas de cultura de tecido de 24 poços com fundo plano (TPP), mantidas em estufa a 37° C com 5% de CO₂ durante 24 e 48 horas.

As culturas foram estimuladas com Antígeno (Ag) Total de *M. tuberculosis* (10 μ g/mL) e o mitógeno concanavalina A (ConA; 2,5 μ g/mL). Culturas mantidas na ausência de estímulos foram utilizadas como controle negativo.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1800 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a –80°C para posterior análise.

4.7. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura

A dosagem de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs foi determinada através do ELISA de captura.

Os anticorpos monoclonais utilizados para esse ensaio, adquiridos da BD OptEIA ELISA Sets (BD Biosciences, San Diego, CA), foram previamente titulados. As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50 µl dos anticorpos anti-citocinas (IL-10, IFN- γ e TNF- α) diluídos em tampão carbonato bicarbonato pH 9.6 e incubadas durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-tweem e incubadas com a solução bloqueadora contendo soro bovino fetal (PBS + 10% SFB) por 1 hora, a T.A. Após lavagens, 50µl da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa foi incubada por 2 horas. Após lavagens, 50 µl da solução detectora (streptavidina conjugada à peroxidase + anticorpos biotinilados diluídos em PBS pH 7.2 + 10% SFB foram adicionados e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas e os imunocomplexos foram detectados com a utilização de 100µl da solução reveladora contendo ABTS (2,2'- azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)). A reação com 50µl de H₂SO₄ 2,5N e a leitura foi realizada no espectrofotômetro (Bio-Rad 3550) a 415 nm. As concentrações dos sobrenadantes foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/mL, utilizando software Microplate Manager, versão 4.0 (Bio-Rad laboratories). O limite de detecção para cada citocina foi de 1,95 pg/mL.

4.8 Dosagem de Óxido Nítrico em sobrenadante de cultura de PBMCs

O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO₂⁻) resultante de sua oxidação no sobrenadante de cultura de células pela reação colorimétrica de Griess. Para isso, combinou-se, em placas de 96 poços, 100

μL da amostra com $100\mu\text{L}$ do reagente de Griess, mistura feita na hora do uso na proporção de 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H_3PO_4 e 0,1% de diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED) (HIBBS et al., 1988). Após 10 minutos a absorbância a 540 nm das diferentes amostras eram comparadas com os valores da curva padrão obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI em concentrações que variavam de 2 a 200 μM . Os resultados foram apresentados como média de duplicatas \pm erro padrão da média de um experimento representativo realizado pelo menos duas vezes.

4.9 Detecção e quantificação de Foxp3 em PBMC

4.9.1 Purificação de RNA

Para obtenção de RNA total, 2×10^6 células/mL, armazenadas em Trizol foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados a cada microtubo $200\mu\text{l}$ de clorofórmio P. A. Após centrifugação a $10.000 \times g$ por dez minutos a 4°C , a fase polar (DNA e RNA) foi separada da fase apolar (resíduos celulares, proteínas). O sobrenadante contendo RNA/DNA foi então transferido para novos microtubos, onde foram adicionados $500\mu\text{l}$ de isopropanol, que promove a precipitação do RNA. Após leve agitação manual e incubação por dez minutos à T. A., as amostras foram novamente centrifugadas a $10.000 \times g$ por dez minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a duas centrifugações a $7.500 \times g$ por cinco minutos a 4°C na presença de álcool 75%. O sobrenadante resultante foi então descartado e o pellet de RNA foi submetido a secagem à T. A., por dez minutos. O RNA foi ressuspenso em água livre de RNase, as amostras foram

levadas ao termobloco por 5 minutos a 65ºC e posteriormente foi feita a dosagem das amostras utilizando o NanoDrop ND-1000 UV-Vis espectrofotômetro (Thermo). Nessa dosagem foi obtida a concentração de RNA em ng/ul e observado o “score” 260/280 para determinar o grau de pureza das amostras sendo consideradas aceitáveis as amostras que obtiveram valores entre 1,8 e 2,1. A partir das concentrações obtidas todas as amostras foram normalizadas para uma mesma concentração. Posteriormente, as amostras foram estocadas a -80ºC até o momento da utilização em ensaios de transcrição reversa.

4.9.2 Ensaio de Transcrição reversa

Para a transcrição reversa foi utilizado o kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems), segundo protocolo do fabricante. A RT-PCR foi realizada em volume final de 40µl, contendo TaqMan RT Buffer 1x, MgCl₂ 5,5mM, Mix de dNTPs 500µM, Hexâmeros randômicos 2,5µM, inibidor de RNase 0,4 U/µL, a enzima *multiscribe reverse transcriptase* 3,125 U/µL e 12,375µL de amostra. A reação consistiu de um ciclo, sendo este dividido em dez minutos a 25ºC, trinta minutos a 48ºC e cinco minutos a 95ºC (termociclador, Eppendorf mastercycler gradient). Após esta etapa, as amostras foram armazenadas a -20ºC até a utilização nos ensaios de PCR em tempo real (qPCR).

4.9.3 Avaliação da expressão gênica para Foxp3

A expressão de mRNA para o Marcador Foxp3 foi avaliada através de PCR em tempo real (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems). A reação foi confeccionada em volume final de 20 μ L, contendo TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), TaqMan Gene Expression Assay para Foxp3 (Assay ID: Hs00203958_m1): constituído de primers e sonda específicos (fluoróforo FAM), água livre de RNase e 1 μ L de amostra. Em paralelo, como controle endógeno (gene de referência) da reação foi utilizado RNA ribossomal 18S (Kit “Taqman Ribosomal RNA Control Reagents”, applied Biosystems), cuja reação foi preparada com TaqMan Universal PCR Master Mix, primers *forward* e *reverse* para RNA ribossomal 18S, sonda para RNA ribossomal 18S (fluoróforo VIC), água livre de RNase e 1 μ L de amostra. A expressão de mRNA para Foxp3 para cada estímulo foi calculada pelo método do Ct comparativo, sendo os valores obtidos normalizados com o gene de referência (Δ Ct). Este cálculo foi feito da seguinte maneira: Δ Ct = Ct (Alvo) – Ct (RNA 18S), onde Ct corresponde ao ponto no gráfico onde a amplificação se torna exponencial. Após a normalização dos valores do gene alvo, o Δ Ct deste foi subtraído do Δ Ct de um elemento calibrador ($\Delta\Delta$ Ct). Este foi escolhido de acordo com a situação a ser analisada, seja em comparação ao grupo controle (indivíduos sem história de Tuberculose) ou entre os grupos de pacientes (Indivíduos com história prévia de tuberculose). Foi utilizada a fórmula : $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (amostra) – Δ Ct (calibrador), onde Δ Ct (amostra) corresponde a um parâmetro de interesse a ser relativizado. Obtido o $\Delta\Delta$ Ct, este é aplicado na fórmula

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t},$$

obtendo-se assim a quantidade relativa de FoxP3 expressa em determinada amostra.

4.10. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Laboratório de Métodos Quantitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do CPqAM. Foi realizada uma análise descritiva, a apresentação das variáveis estudadas foi feita através de tabelas ou gráficos, além do cálculo de medidas descritivas como: média, mínimo, máximo, desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado o Mann-Whitney e teste t-student quando observado a normalidade das variáveis. Para a análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste Qui-quadrado ou exato de Fisher quando necessário. E, para a análise de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2003, o Graphpad Prism 5.0 e o R 2.10.0.

5. RESULTADOS

5.1. População de estudo

Os participantes do estudo foram selecionados segundo os critérios de faixa etária, sexo, contato intradomiciliar com paciente doente com tuberculose pulmonar a pelo menos cinco anos antes das coletas. Na população estudada, 17 indivíduos (29,82%) fizeram parte do grupo CTb e 40 (70,18%) estavam entre STb. A faixa etária variou de 14 a 80 anos, sendo 22 indivíduos do sexo masculino (38,6%) e 35 do sexo feminino (61,4%). O grupo CTb apresentou um predomínio do sexo masculino (70,59%), enquanto no grupo STb verificou-se maior freqüência do sexo feminino (75%) (Tabela 1).

Foi realizado o teste da intradermorreação (PPD) em 31 (54,4%) dos indivíduos, os quais, a maioria apresentou resultado > 10 mm (Tabela 1). Em relação à vacinação com BCG no grupo CTb um total de 12 indivíduos (70,59%) não apresentavam marca de vacina enquanto que no grupo STb apenas 14 indivíduos (35%) não foram vacinados contra tuberculose (Tabela 1). Considerando o vínculo familiar do grupo STb com os indivíduos do grupo CTb, 33 indivíduos (82,5%) eram parentes dos casos e 7 (17,5%) eram agregados (Tabela 2).

Tabela 2. Dados descritivos da população estudada.

Variáveis	CTb		STb	
	N	%	N	%
Idade				
14 a 35	6	35,29	24	60,00
36 a 50	6	35,29	5	12,50
50 +	5	29,41	11	27,50
Sexo				
Feminino	5	29,41	30	75,00
Masculino	12	70,59	10	25,00
Resultado do PPD				
<= 10 mm	1	12,50	12	52,17
> 10 mm	7	87,50	11	47,83
Marca de BCG				
Sim	5	29,41	26	65,00
Não	12	70,59	14	35,00
Grau de parentesco				
Agregado			7	17,50
Parente			33	82,50

n= tamanho da amostra PPD= derivado protéico purificado

Qui-Quadrado, *Teste exato de Fisher

5.2. Parasitológicos

Amostras de fezes foram analisadas pela técnica de HOFFMAN (1934). Observamos a freqüência dos resultados positivos e negativos entre a população total selecionada na primeira triagem no Centro de Saúde Herbet de Souza. Dentre as amostras analisadas, 52,63% foram negativas e 47,37% mostraram-se positivas para no mínimo um parasita.

A Tabela 3 apresenta a descrição dos respectivos parasitas e o número de indivíduos infectados por parasita.

Tabela 3. Lista de parasitas diagnosticados nas 34 famílias selecionadas.

Parasitas	N	%
<i>Entamoeba coli</i>	21	29,6
<i>Ascaris lumbricoides</i>	16	22,5
<i>Ancilostomídeo</i>	15	21,1
<i>Endolimax nana</i>	13	18,3
<i>Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar</i>	10	14,1
<i>Trichuris trichiura</i>	10	14,1
<i>Enterobius vermicularis</i>	5	7,0
<i>Schistosoma mansoni</i>	4	5,6
<i>Giardia lamblia</i>	3	4,2
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	1,4
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	1	1,4
TOTAL	99	100%

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos CTb (n=17) e STb (n= 40) em relação aos resultados dos parasitológicos. Os dados parasitológicos do estudo são mostrados na Tabela 4.

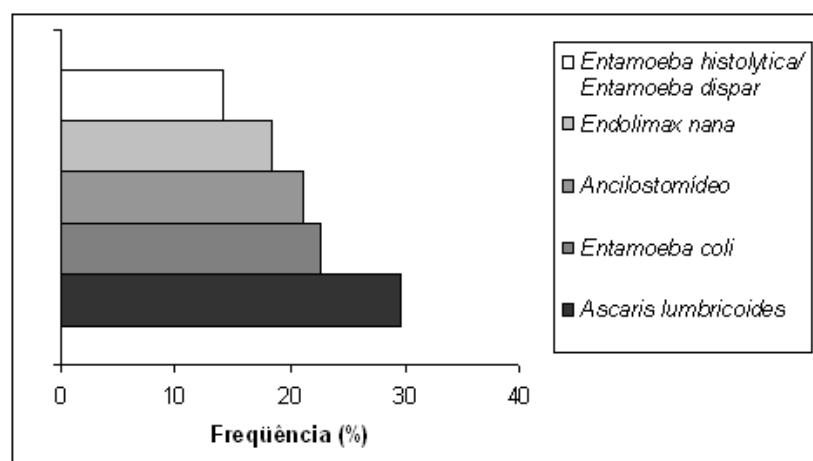
Tabela 4. Freqüência de enteroparasitoses por grupo estudado de indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar.

Parasitológico	CTb		STb		p-valor
	N	%	N	%	
Positivo	7	41,82	20	50,00	0,7486
Negativo	10	58,82	20	50,00	

Qui-quadrado

Dos 57 indivíduos, seis estavam co-infectados, 21 infectados com apenas um parasita e 30 indivíduos apresentaram parasitológico de fezes negativo. Entre o grupo CTb os resultados apresentaram 7 indivíduos parasitados, onde 3 apresentaram infecção por *Ascaris lumbricoides* e os demais apresentaram infecção por *Endolimax nana* (2) e *Entamoeba coli* (3), sendo 1 indivíduo co-infectado com *A. lumbricoides* e *E. coli*. Os grupos CTb e STb apresentaram uma maior freqüência de infecção por *E. coli* e *A. lumbricoides* (Figura 3).

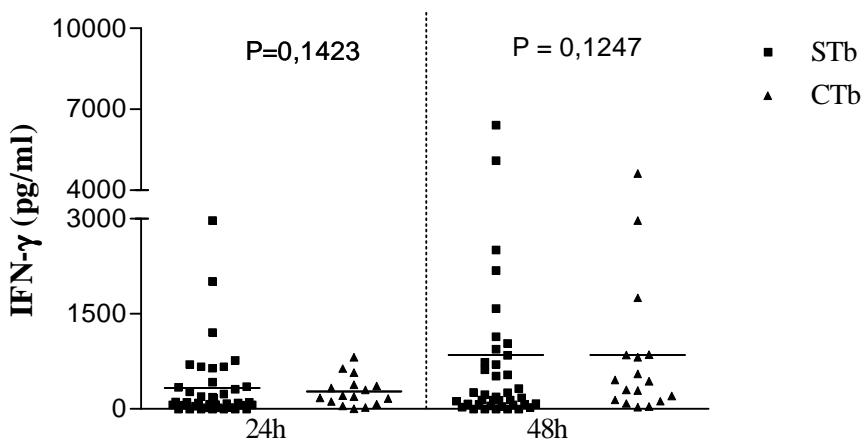
Figura 3. Freqüência de parasitas intestinais na população estudada em indivíduos positivos.



5.3. Avaliação da produção de IFN- γ

A produção de IFN- γ (pg/mL) foi determinada no sobrenadante de cultura de PBMC após 24 e 48 horas de estímulo, utilizando 10 μ g/mL do antígeno total de *M. tuberculosis*, do mitógeno ConA (2,5 μ g/mL) e na ausência de estímulo. Os resultados demonstram que, embora não tem havido diferença estatisticamente significante, houve uma maior produção de IFN- γ no grupo STb quando as culturas foram estimuladas com AgTb e que o melhor tempo para essa avaliação foi em 48 horas de cultivo (Figura 4). As estatísticas descritivas dessa citocina estão indicadas no anexo 2.

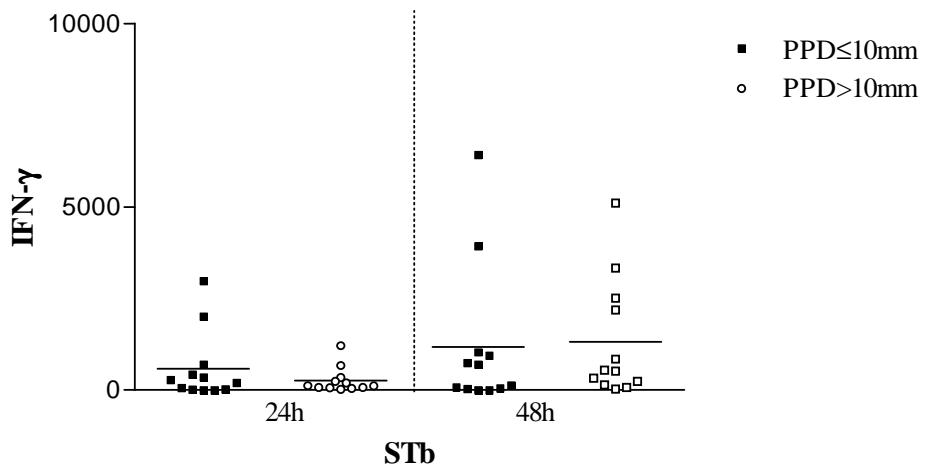
Figura 4. Produção de IFN- γ em 24 e 48 horas de estímulo com antígeno total do *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos CTb e STb.



Realizamos um estudo paralelo com o grupo de indivíduos que obtivemos resultados do teste PPD e também testamos se houve alguma diferença entre os indivíduos vacinados com BCG. Os resultados demonstram que os grupos analisados produziram quantidades de IFN- γ semelhantes quando as PBMCs foram estimuladas

com o antígeno total de *M. tuberculosis*. As estatísticas descritivas dessa produção estão indicadas nos anexos 4 e 5. Podemos observar uma maior produção de IFN- γ no grupo de indivíduos com PPD \leq 10 mm quando as culturas foram estimuladas com AgTb quando comparamos com o grupo PPD $>$ 10 mm no tempo de 24 horas ($p = 0,7793$) (Figura 5).

Figura 5. Produção de IFN- γ em 24 e 48 horas de estímulo com antígeno total do *Mycobacterium tuberculosis* X PPD em indivíduos STb



Em relação à presença de marca de BCG, observamos um aumento na produção de IFN- γ após 48 horas de estímulo com AgTb ($936,23 \pm 1.518,04$) com uma discreta diferença na produção desta citocina nos indivíduos com marca de vacinação (tabela 5).

Tabela 5 – Produção de IFN- γ (pg/ml) X Marca de BCG

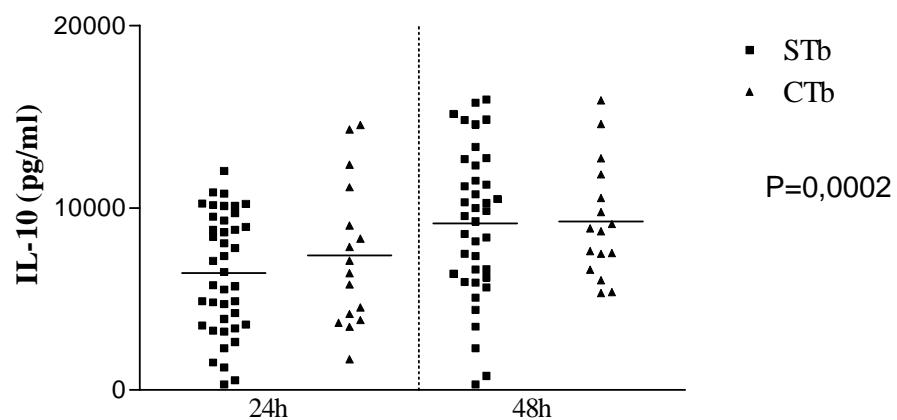
	Variáveis	N	Min	Max	Média	Desvio	p-valor
							0,8473
	Antígeno						
IFN-γ– 24 horas	Sim	31	0	2976	310,13	551,74	
Marca da BCG	Não	26	0	2016	317,42	447,26	
	Antígeno						0,7486
INF-γ – 48 horas	Sim	31	0	6420	936,23	1.518,04	
Marca da BCG	Não	26	0	4612	784,50	1.230,90	

Mann-Whitney

5.4. Avaliação da produção de IL-10

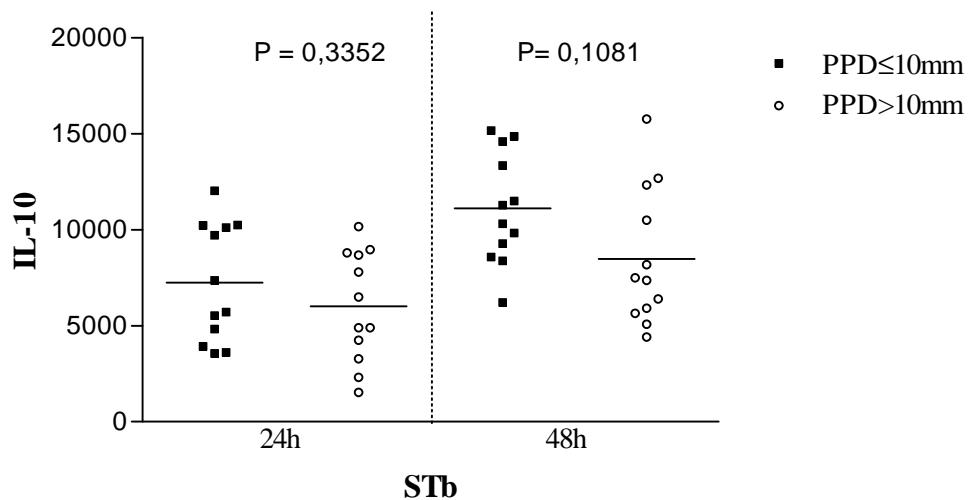
Em relação à produção de IL-10 (pg/mL) em 24 e 48 horas de cultivo com o antígeno total de *M. tuberculosis* observamos um aumento significativo ($p=0,0002$) (Figura 6).

Figura 6 – Produção de IL-10 em STb e CTb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb.



O estudo com o grupo de indivíduos que apresentaram resultados do teste PPD e a avaliação referente à marca de BCG também não demonstraram diferença significativa nas culturas estimuladas com o antígeno total de *M. tuberculosis*. Na figura 7 observamos as respostas referentes às análises entre o teste PPD e a secreção de IL-10 entre os indivíduos STb. Entre os grupos com e sem marca de BCG não foi observada diferença significativa em nenhum dos estímulos e nas culturas apenas com meio (anexo 8).

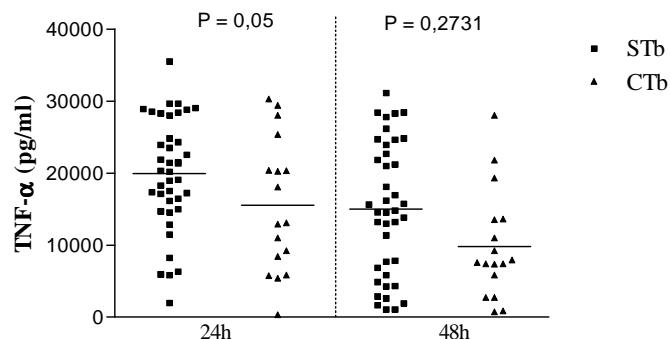
Figura 7 – Produção de IL-10 em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD.



5.5. Avaliação da produção de TNF- α

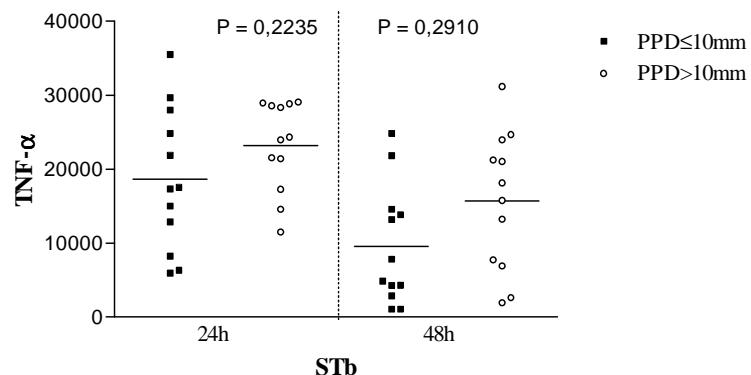
Em 24 horas de cultivo celular com antígeno total de *M. tuberculosis* (CTb = $10.158,38 \pm 7.438,38$; STb = $15.083,10 \pm 9.292,66$), observou-se uma produção significativa de TNF- α (0,05) no grupo STb em relação ao grupo CTb. As estatísticas descritivas dessa citocina estão indicadas no anexo 9.

Figura 8 – Produção de TNF- α durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag TB.



Comparando os resultados dos indivíduos que realizaram o teste PPD (Figura 9) e também quando comparados com a presença de marca de BCG observamos quantidades de TNF- α similares, quando as PBMCs foram estimuladas com o antígeno TB. Também pode ser observado, o aumento dessa citocina quando o estímulo foi a ConA em 24 ($p= 0,030$) e 48 ($p= 0,027$) horas, apresentando diferença significativa entre os grupos de indivíduos com PPD ≤ 10 e > 10 (anexo10).

Figura 9 – Produção de TNF- α em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD.



5.6. Avaliação da produção de Óxido Nítrico

Em 24 e 48 horas de cultivo celular, a produção de NO foi semelhante entre os grupos analisados. A Figura 10 apresenta os resultados da população estudada em relação aos períodos de 24 e 48 horas de estímulo com o antígeno TB onde observamos que foram produzidas quantidades de NO similares nos dois períodos analisados.

Avaliando a produção de NO nos indivíduos com teste de PPD, observa-se uma produção semelhante nos grupos estudados em 24 e 48 horas (Figura 11).

Figura 10 – Produção de NO durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag TB em PBMC de indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar.

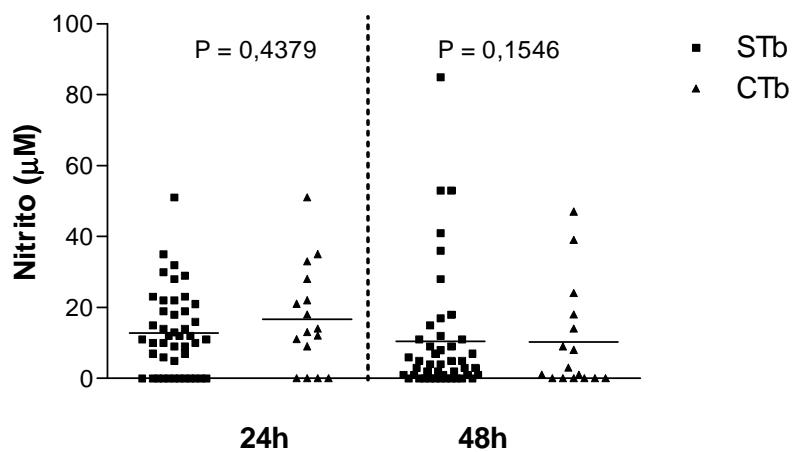
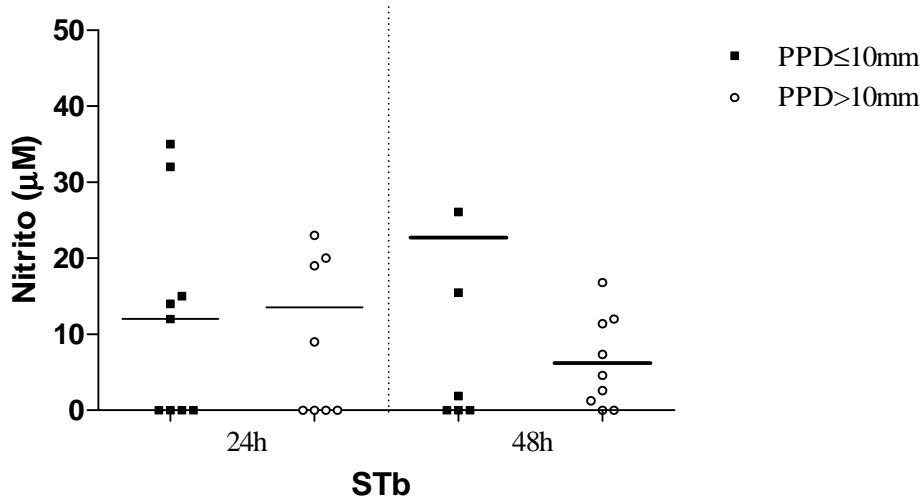


Figura 11 – Produção de NO em STb durante 24 e 48 horas de culturas estimuladas com Ag Tb X PPD.



5.7. Expressão Gênica para Foxp3 por PBMC

A Figura 12 mostra a expressão de mRNA para Foxp3 por PBMC de indivíduos com história prévia de Tuberculose e indivíduos sem história prévia de tuberculose, após normalização com o gene de referência.

Sob o estímulo do antígeno de *M. tuberculosis*, os grupos analisados não apresentaram diferenças na expressão do mRNA do marcador Foxp3. Os valores descritivos estão indicados na tabela 6.

Como indicado nos anexos 15 e 16, os resultados demonstram que os comunicantes com resultados do teste PPD e também quando comparados com a presença de marca de BCG expressaram quantidades de Foxp3 similares. Observamos na figura 13 o gráfico referente aos resultados do Foxp3 comparados com os resultados do PPD no grupo STb.

Figura 12 - Expressão gênica para mRNA Foxp3 por PBMC de indivíduos com história de Tuberculose (CTb) e de indivíduos sem história de Tuberculose (STb). Nota: As células foram estimuladas por Concavalina A (ConA, 2,5ug/ml) e Antígeno de *M. tuberculosis* (AgTb, 10ug/ml)

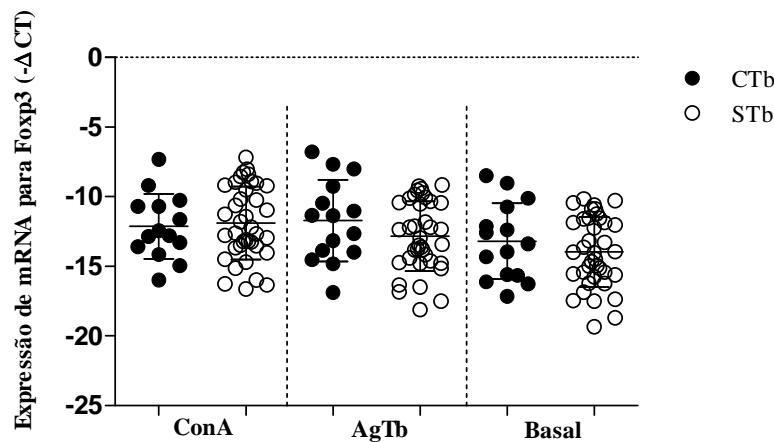
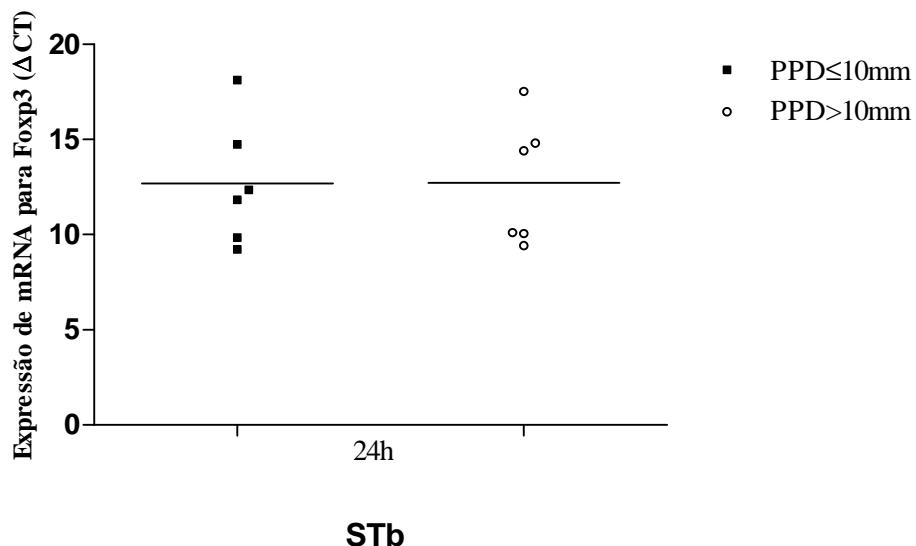


Tabela 6- Expressão gênica do mRNA do marcador Foxp3 em indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar.

Estímulos	N	Min	Max	Média	Desvio	p-valor
ConA						0,7511
CTb	14	7	16	12,14	2,34	
STb	38	7	16,64	11,9	2,62	
Foxp3 – 24 horas						0,21
Antígeno						
CTb	15	7	16,89	11,72	2,93	
STb	37	9,15	18,12	12,83	2,52	
						0,3512
Basal						
CTb	15	8	17,15	13,2	2,73	
STb	38	10	19,34	13,87	2,52	

Figura 13- Expressão gênica do mRNA do marcador Foxp3 X PPD em indivíduos STb.



5.8 Correlação entre os resultados imunológicos e moleculares obtidos dos indivíduos CTb e STb

A correlação entre as citocinas estudadas e a expressão de mRNA para o marcador Foxp3 foi avaliada através do teste de correlação Pearson e os resultados estão descritos nos anexos 17 e 18.

Embora sem diferenças significativas, podemos destacar a correlação negativa entre IL-10 e TNF- α ($r = -0,31$; $p = 0,06$) no período de 24 horas de cultivo no grupo STb; e correlação positiva entre NO e TNF- α ($r = 0,35$; $p = 0,08$) no mesmo grupo durante 24 horas de cultivo e no tempo de 48 horas de cultivo co AgTb ($r = 0,28$; $p = 0,09$). As demais correlações do grupo STb estão descritas no anexo 18.

Em relação ao grupo CTb, encontramos correlação positiva no tempo de 48 horas de cultivo entre o NO e IFN- γ ($r = 0,55$; $p = 0,07$) e também entre o IFN- γ e TNF-

α ($r = 0,26$; $p = 0,34$). Observamos no anexo 17 todos os resultados das correlações no grupo CTb.

Considerando-se as correlações significativas, destacamos no grupo CTb, correlação positiva entre IL-10 X Foxp3 após 48 horas de cultura de células estimuladas com Ag Tb ($p = 0,04$) (Figura 14). Por outro lado, correlação negativa foi observada entre NO X Foxp3 quando as culturas foram estimuladas com AgTb ($p = 0,013$) após 48 horas. Essa mesma correlação ocorreu no grupo STb, sendo em 24 horas de culturas estimuladas com AgTb ($p = 0,03$) (Figura 15 A e 15B).

Figura 14- Correlação IL-10 X Foxp3 (48 horas) grupo CTb.

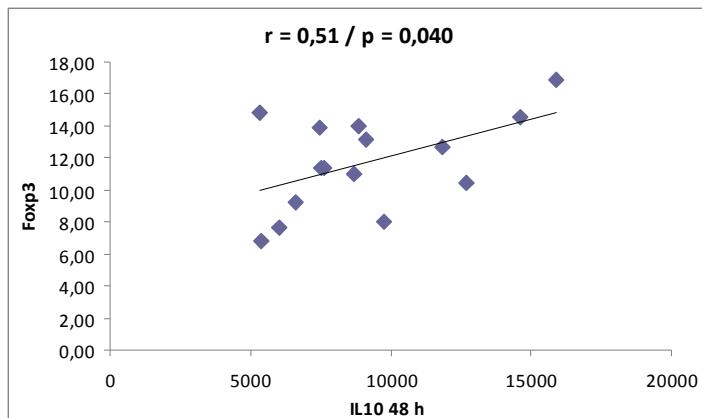


Figura 15A- Correlação NO X Foxp3 (48 horas) grupo CTb.

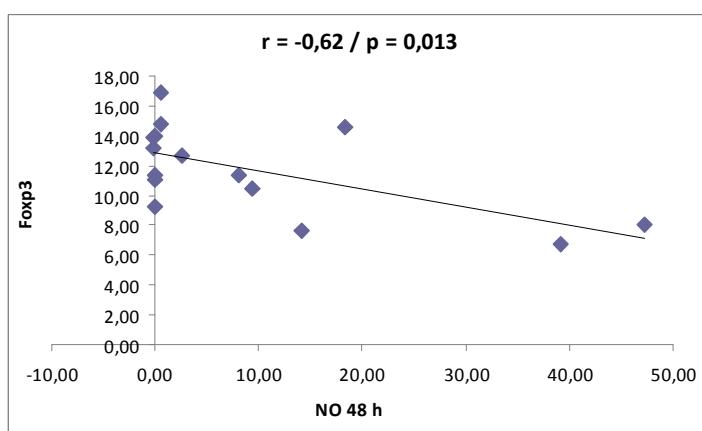
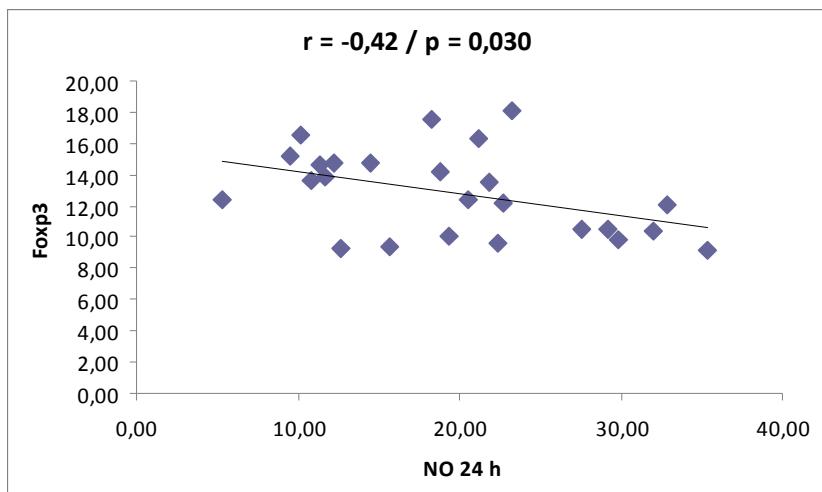


Figura 15B- Correlação NO X Foxp3 (24 horas) grupo STb.



6. DISCUSSÃO

A tuberculose pulmonar é uma doença infecciosa, transmitida de pessoas com a doença respiratória ativa através de gotículas com secreções respiratórias. Em pessoas saudáveis, a infecção pelo *M. tuberculosis* muitas vezes não causa sintomas, desde que o sistema imunológico da pessoa responda de forma competente e "isolem" as bactérias (WHO, 2012). A hipótese mais provável sustenta que indivíduos com tuberculose-doença desenvolvem uma resposta Th2, e que na tuberculose-infecção a resposta está polarizada para o perfil Th1 (DLUGOVIZKY et al., 1997; BAI et al., 2004). Em estudos que compararam as respostas entre pacientes e contatos foram encontrados resultados que confirmam essa hipótese (DLUGOVITZKY et al., 1997; PRABHA et al., 2007).

Os mecanismos imunológicos desenvolvidos pelo hospedeiro que direcionam a infecção pelo *M. tuberculosis* para um desenvolvimento da doença clínica ou para manutenção do estado de saúde e contenção dos bacilos são avaliados por diferentes grupos (CHEGOU et al., 2012; HESSELING et al., 2009; CHEGOU et al., 2009; HARARI et al., 2011). Torna-se de fundamental importância entender que fatores são decisivos para o desenvolvimento da tuberculose pulmonar, uma vez que enquanto uns indivíduos expostos aos bacilos nas mesmas condições sócio-ambientais desenvolvem a TB doença, outros permanecem saudáveis desenvolvendo a TB infecção.

O estudo de comunicantes domiciliares de pacientes com doenças infecciosas é clássico no campo da saúde pública, sendo bastante utilizado na investigação de surtos (HILL & OTA, 2010).

No entanto, para que os resultados encontrados sejam mais próximos da realidade dos indivíduos que apresentam uma doença que esteja sendo estudada, em nosso caso, tuberculose pulmonar, é necessário adequar às condições das análises e minimizar os possíveis erros de resultados devido a variáveis que possam alterar a resposta imunológica, por exemplo. Nessa compreensão, no presente estudo, foram excluídos os pacientes HIV positivos e também foi avaliada a presença ou não de parasitos intestinais.

A avaliação parasitológica dos indivíduos do presente estudo mostrou que *A. lumbricoides* foi o parasito de maior incidência, seguido por *E. coli*. É de conhecimento que helmintos induzem uma forte resposta Th2, promovendo a secreção de muco e mecanismos de cicatrização, eventos críticos para a expulsão dos vermes. Apesar da indução da resposta protetora, esses parasitas são capazes de persistir no hospedeiro por longo período de tempo, resultado em infecção crônica (ALLEN & MAIZELS, 2011).

As citocinas geradas numa resposta Th2 são potentes inibidores da resposta Th1 Mtb-específica, em especial a IL-4 (ROOK, 2007), IL-10 (REDFORD et al., 2011) e TGF- β . Nos humanos, a reativação da tuberculose latente está associada com a produção de IL-10 e TGF β por monócitos circulantes e possivelmente células Tregs, que suprimem a produção das citocinas Th1 (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006). Em infecções concomitantes por helmintos intestinais em pacientes com tuberculose foram encontrados baixos níveis de IFN- γ (RESENDE et al., 2007). BORKOW et al., 2001 mostraram que a resposta humoral associada à proteção na infecção parasitária favorece a infecção pelo *M. tuberculosis* e que essas infecções por helmintos podem ser um fator de risco ao desenvolvimento da tuberculose ativa (BORKOW et al., 2001).

Elias et al., 2005 observaram em modelos animais e em ensaios pré-clínicos indução de resposta Th1 pelo uso da vacina BCG e que a infecção com parasitas

helmínticos prejudica essas respostas Th1. Em outro estudo, o grupo de Elias et al. (2008) mostrou que a infecção helmíntica prejudica a secreção de IFN- γ produzido por PBMCs estimuladas com PPD após a vacinação com BCG. Os dados apresentados demonstram que a infecção crônica por parasita reduz a imunogenicidade de BCG em seres humanos, o que foi associado com a produção aumentada de TGF- β (ELIAS et al., 2008).

Kalinkovich et al. (1998) mostraram que essas infecções causam alterações nas células T e modificam o perfil da ativação das células T; dessa forma, exerce um grande impacto na resposta imune do hospedeiro. Além disso, infecções intestinais não induzem apenas uma resposta imune parasita-específica, mas também ativam a resposta imune no sistema policlonal, a qual pode interferir com outras doenças, podendo dificultar ou melhorar a capacidade do hospedeiro de se defender contra patógenos (GOPINATH et al., 2000). Vale ressaltar que o tratamento com fármacos anti-helmínticos restaura a resposta protetora Th1. Isso sugere que o efeito imunomodulador nas infecções por helminhos é transitório-dependente (BABU et al., 2009).

Diante da influência dos parasitas intestinais na resposta imunológica de pacientes, além da exclusão no presente trabalho dos indivíduos HIV positivos, o tratamento das parasitoses intestinais dos pacientes foi realizado.

Diferença entre o número de homens e mulheres foi observada na população estudada. No grupo STb predominou o sexo feminino, e no CTb o sexo masculino foi mais frequente. A tuberculose sempre foi descrita como mais incidente em homens, fato este observado nos indivíduos do grupo CTb. Segundo GALESI (2003), os doentes do sexo masculino têm 1,6 vezes mais chance de serem internados do que os do sexo feminino. É conhecido que os homens adoecem de tuberculose em maior

proporção que as mulheres. Isso pode ser devido as desigualdades relacionadas ao sexo, entendendo como tal não apenas as diferenças fenotípicas entre os gêneros masculino e feminino, mas também a variedade de comportamentos, expectativas e papéis na sociedade (SINGLETON et al., 1997).

Estudo recente BATRA e colaboradores (2012) fizeram uma análise retrospectiva de crianças (<15 anos), que foram contatos domiciliares de pacientes com TB, durante o período de 2008 a 2010. Encontraram uma taxa de positividade de 32,6% entre os casos pulmonares, sugerindo seu potencial para espalhar a doença, além de enfatizar a necessidade de rever a contribuição das crianças na transmissão da tuberculose nas comunidades. Concluíram que há maior vulnerabilidade da criança do sexo feminino e que o papel considerável da mãe na transmissão da doença destaca a necessidade de direcionar as mulheres em programas de controle da tuberculose no Paquistão (BATRA, 2012).

Em relação ao teste do PPD, medidas acima de 10 mm predominaram no grupo CTb. Praticamente metade dos indivíduos no grupo STb apresentaram essas medidas. A prova tuberculínica indica se o organismo foi infectado pelo bacilo da tuberculose. Embora não permita distinguir entre infecção e doença, em algumas situações, como na criança e indivíduos comunicantes, porém, ajuda na definição diagnóstica (CAMPOS, 2006).

O teste PPD com uma reação fraca (5-9mm) pode representar infecção pelo bacilo da tuberculose ou outras micobactérias não tuberculosas, ou ainda vacinação com BCG. A reação forte (acima de 10mm) tanto pode demonstrar infecção ativa ou vacinação recente com BCG. Como a vacinação com BCG no Brasil é realizada em massa por muitas décadas, há uma interferência na resposta ao PPD. No entanto, em

indivíduos comunicantes de indivíduos bacilíferos esse teste é de grande importância para a vigilância de possíveis casos novos (BRASIL, 2002).

A marca de vacinação por BCG também foi investigada. No grupo CTb a maioria não apresentou marca de vacinação. O contrário ocorreu no grupo STb. Portanto, verificou-se que os indivíduos vacinados encontravam-se no grupo STb, ou seja, não desenvolveram a doença, sugerindo algum componente protetor associado a vacinação (MS, 2010).

A população do presente estudo foi exposta igualmente ao bacilo da tuberculose através do contato intradomiciliar com indivíduo bacilífero. No entanto, embora tenham estado nas mesmas condições sócio-ambientais, em momento anterior às coletas, alguns indivíduos comunicantes desenvolveram a doença ativa e outros permaneceram saudáveis. Por isso, o referido estudo vem contribuir para o entendimento da resposta frente ao antígeno de *M. tuberculosis* em indivíduos que se encontravam nas mesmas condições ambientais e nutricionais, ou seja, condições chaves para a infecção pelo *M. tuberculosis*. No entanto, outros fatores provavelmente devem ter contribuído de forma decisiva para o desenvolvimento da TB-doença.

Lucen-Silva et al. (2010) verificaram que diferentes alelos HLA de classe II foram associados com a susceptibilidade a tuberculose, incluindo DRB1*1501 em indianos e mexicanos, DRB1 * 1601 e DQB1 * 0502 em poloneses, DRB1 * 07 e DQA1 * 0101 em iranianos e DQB1 * 0502 em tailandeses. Outros genes não-HLA envolvidos na montagem da resposta imune contra patógenos têm sido investigados como um marcadores moleculares de susceptibilidade genética para a tuberculose, incluindo sítios polimórficos em IFN- γ , IL -12, IL-12R, IL-14 (LUCENA-SILVA et al., 2010).

Além disso, fatores imunológicos podem também ter contribuído para a manifestação da doença no grupo CTb do presente estudo. Portanto, o perfil de citocinas foi avaliado nos indivíduos com e sem história de tuberculose pulmonar.

Em relação as citocinas IFN- γ e IL10, avaliadas em nosso trabalho, diversos autores descreveram que em tuberculose ativa ocorre uma diminuição da produção de IFN- γ e um aumento da IL-10 (FLYNN et al., 1993; TORRES et al., 1998; OTTENHOFF et al., 2005; NORTH & JUNG, 2004; SALGAME, 2005). No entanto, sentimos falta de mais estudos com análises em indivíduos comunicantes intradomiciliares. Embora sem diferença significativa, a população STb produziu mais IFN γ no tempo de 48 horas sob estímulo com AgTb. Quando comparamos com o resultado do PPD, observamos um leve aumento no grupo com PPD \leq 10mm em 24 horas de estímulo. Esses resultados estão coerentes com os perfis encontrados em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis*. A produção mais elevada de IFN γ pode ter funcionado como um evento importante para a manutenção do estado de saúde desses indivíduos quando expostos à bactéria em momento anterior as coletas de sangue. Podemos supor que em nossa população, devido ao número de indivíduos, não tenhamos encontrado diferença significativa nessas análises.

Alguns trabalhos avaliaram o perfil de citocinas em grupos de indivíduos comunicantes saudáveis. Entre esses trabalhos é importante citar Demissie et al. (2004). Esse grupo realizou um estudo comparando a resposta imune de indivíduos saudáveis de área endêmica, caracterizados como saudáveis infectados em estágio latente, com pacientes TB. Os resultados demonstraram que os pacientes TB apresentam uma baixa regulação na expressão de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) comparados com os indivíduos com infecção latente. Isto sugere que o controle da TB no estágio latente esteja associado não somente a expressão aumentada das citocinas Th1, mas com a supressão da atividade da IL-4 (DEMISSIE et al., 2004).

Reforçando esta idéia, em 2006 o mesmo grupo comparou a expressão de IL-4 e IFN- γ em sangue periférico de contatos intradomiciliares de pacientes TB com escarro positivo. Os resultados demonstraram que a expressão da IL-4 foi ligeiramente elevada nos contatos intradomiciliares comparados aos controles da comunidade. Entretanto, quando o grupo do contato intradomiciliar foi dividido em grupos com ou sem sinais imunológicos da infecção pelo *M. tuberculosis*, a expressão da IL-4 foi claramente elevada no grupo ESAT-6 positivo e a expressão de citocinas Th1 como o IFN- γ foi baixa. Assim, eles sugerem que uma forte resposta ao ESAT-6 em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* tem correlação com uma baixa expressão de IFN- γ e mais elevada expressão de IL-4, e que possivelmente, este perfil está associado a um mau prognóstico para esse grupo de indivíduos. ESAT-6 é um antígeno secretado pelo *M. tuberculosis*, potente ativador de células T humanas (WANG et al., 2009). Porém, em nosso estudo não foi possível confirmar esta relação uma vez que, nos dois grupos analisados (CTb e STb) não houve diferença significativa na produção de IFN- γ .

Torres et al. (1998) estudaram a resposta imune de PBMC de pacientes com tuberculose ativa e seus contatos intradomiciliares saudáveis em resposta ao antígeno de 30-KDa do *M. tuberculosis*. Seus resultados mostraram uma falha na produção de IFN- γ pelos pacientes em resposta ao antígeno estudado e uma forte resposta a este antígeno pelas células dos comunicantes sadios, sugerindo um papel protetor do IFN- γ nestes indivíduos. PAIS et al. (1998) mostraram também uma diminuição de IFN- γ na resposta frente ao antígeno de 32 kDa em pacientes com tuberculose quando comparados com controles sadios.

Diferenças inter-individuais também têm sido observadas na produção de IFN- γ e alguns estudos demonstraram uma diminuição na produção de IFN- γ na tuberculose ativa (LIN et al., 1996; ZHANG et al., 1995). Em nosso estudo, esta relação pode não ter sido confirmada pela ausência de indivíduos com TB ativa.

Podemos justificar que a baixa produção de IFN- γ nos indivíduos de nosso estudo pode ser devido à participação de outras citocinas envolvidas na tuberculose, ou seja, reforça a idéia de que a resposta protetora contra *M. tuberculosis* é dependente não apenas de IFN- γ (TOMIOKA et al., 2011; KHADER et al., 2007)

Por outro lado, o IFN- γ pode também, suprimir a resposta imune afetando a célula Th2. Portanto, a função regulatória desta citocina pode danificar o estabelecimento e a manutenção da memória Th1. O desenvolvimento e a sobrevivência das células Th1 de memória ainda não são bem estudados, porque a maioria das pesquisas relacionadas com células T de memória da população CD4 $^{+}$ são direcionadas para imunidade Th2 (WU et al., 2002). Vários estudos (WINSLOW et al., 2003; ANDERSEN & SMEDEGAARD, 2000; WU et al., 2002) demonstraram um papel independente do IFN- γ para a memória das células T CD4 $^{+}$ na proteção funcional encontrada na tuberculose.

Alguns estudos analisando o perfil das citocinas produzidas por pacientes TB têm apresentado resultados inconsistentes. Algumas evidências demonstraram que a síntese de IFN- γ e IL-4 em resposta a estimulação com antígenos micobacterianos são respectivamente diminuídos e inalterados (SÁNCHEZ et al., 1994; ZHANG et al., 1994). Dados concordantes com os encontrados nesta pesquisa.

O papel do TNF- α no controle da infecção causada pelo *M. tuberculosis* é complexo. Sabe-se que ele atua em sinergismo com o IFN- γ induzindo a formação de reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio, mediando assim à ação tuberculostática dos macrófagos (MOHAN et al., 2001). Porém, o TNF- α também parece estar relacionado com a resposta patológica na infecção causada pelo *M. tuberculosis* e freqüentemente é citado como o principal mediador da destruição do tecido pulmonar (FLYNN et al., 2001). Moura (2002) avaliando a resposta celular de

pacientes antes e após o tratamento observou que os pacientes com tuberculose pulmonar ativa produziram TNF- α em níveis elevados, porém não observou diferença significativa nos níveis desta citocina após o tratamento. Concluiu que estes resultados reforçam o papel desta citocina tanto na fisiopatologia da doença quanto na imunidade protetora.

Olobo e colaboradores (2001) mostraram que os contatos saudáveis de pacientes com tuberculose pulmonar tiveram níveis plasmáticos elevados de TNF- α e IL-10. Já os pacientes com tuberculose pulmonar, apresentaram níveis elevados de TGF- β e IL-10 no plasma. De modo similar ao trabalho de Olobo (2001), podemos sugerir que TNF- α produzida pode estar atuando como citocina protetora, modulando a ação de citocinas associadas com imunossupressão como a IL10, uma vez que não houve diferença entre os grupos analisados.

Em relação a IL-10, também podemos sugerir que os níveis obtidos em nosso trabalho podem estar sendo produzidos pelas células T de memória reestimuladas “*in vitro*”, como é relatado na literatura em alguns estudos em tuberculose (SHAMS et al., 2001; FLANAGAN et al., 2001). É possível sugerir que o perfil de citocinas produzidas pode ser por subpopulações de células T de memória central, as quais têm sido consideradas cruciais na constituição de respostas vacinais protetoras (REECE et al., 2005). Ou então, assim como sugere Olobo et al. (2001), esses níveis são devido ao estímulo dos抗ígenos micobacterianos que induzem a produção dessa citocina por células mononucleares. Por outro lado, podemos sugerir que a IL-10 esteve envolvida na defesa natural que vai de encontro às respostas pró-inflamatórias excessivas geradas pelo TNF- α . Portanto, sugerimos que a presença simultânea de IL-10 e de TNF- α nos comunicantes dos pacientes TB, pode ser

benéfica a esses indivíduos. A IL-10 pode, talvez, ser exigida para modular efeitos pró-inflamatórios adicionais em doentes e também em indivíduos comunicantes saudáveis.

Em modelo animal de tuberculose primária progressiva, a IL-10 não foi detectada até pelo menos 6 meses de infecção com *M. tuberculosis*, e demonstraram nestes estudos que linhagens de camundongos C57BL/6 produzem pouca IL-10 durante a infecção crônica. Estes resultados sugerem que a produção de IL-10 não está associada com o controle inicial da infecção, mas que esta citocina pode ser mais importante durante a tuberculose crônica ou na fase latente (TURNER et al., 2002).

Além de várias citocinas envolvidas na resposta ao *M. tuberculosis*, outros mediadores importantes são citados como fatores essenciais para a contenção dos bacilos, entre eles, destaca-se o óxido nítrico.

A produção de óxido nítrico também foi avaliada no presente estudo nas culturas estimuladas com antígeno *M. tuberculosis*. Houve produção de NO de maneira semelhante nos grupos estudados sem diferença significativa entre os comunicantes com história e sem história de tuberculose pulmonar. Indivíduos imunocompetentes possuem o sistema imune capaz de montar respostas inatas e adaptativas eficientes que controlam e eliminam o *M. tuberculosis*. A produção de reativos intermediários do oxigênio e reativos intermediários do nitrogênio pelas células da resposta inata é considerada relativamente eficiente no mecanismo de defesa contra microrganismos patogênicos. A alta expressão de NO em resposta a citocinas e as moléculas derivadas dos patógenos é um importante componente na resposta de defesa contra microrganismos intracelulares (CHAN et al., 2001).

No entanto, trabalhos demonstraram que a atividade micobacteriostática dos macrófagos alveolares humanos é NO-independente (NATHAN & SHILOH, 2000). Interessante é que o IFN- γ exógeno não inibiu o crescimento da micobactéria nos

macrófagos humanos. Há evidências que o NO produzido por macrófagos humanos infectados com *M. tuberculosis* e células epiteliais tenham também uma ação antimicobacteriana (POIRIER & AV-GAY, 2012).

Baseados nos resultados encontrados na literatura podemos ressaltar que os níveis encontrados nos grupos analisados em nosso estudo estão de acordo com o esperado. Ou seja, embora seja comprovada a importância do NO nas infecções intracelulares, na tuberculose existem alternativas usadas pelos bacilos que “driblam” os efeitos antimicrobianos do NO (MARTIN et al., 2011).

Outro aspecto importante para o entendimento dos fatores envolvidos com uma predisposição ou proteção na exposição ao bacilo da tuberculose é a identificação de marcadores moleculares (HERZMANN et al., 2012). O Fator de Transcrição Foxp3 é considerado um regulador positivo da função das Treg, sendo, portanto, um candidato a marcador molecular associado com uma predisposição em muitas doenças infecciosas (WU et al., 2006; SINGH et al., 2012; LEEPIYASAKULCHAI et al., 2012).

A ativação de células Tregs, identificadas pela expressão do Foxp3, pode evitar uma excessiva resposta inflamatória e / ou pode comprometer a eliminação de *M. tuberculosis* (SHARMA et al., 2009). Hougardy et al., (2007) observaram níveis mais elevados de células Treg CD4⁺CD25 Foxp3⁺ no sangue periférico de pacientes com TB em comparação com os níveis encontrados nas células infectadas de forma latente com o *M. tuberculosis* (indivíduos saudáveis) e dos controles não infectados quando estimuladas com BCG. Mesmo não verificando diferença significativa na expressão de Foxp3 nos indivíduos avaliados em nosso estudo, concordamos com Hougardy e colaboradores (2007) e podemos sugerir que a expressão de Foxp3 pode ser associada a um perfil de predisposição a progressão para a tuberculose ativa e pode desempenhar um papel importante na patogênese da doença, devido aos nossos

resultados que demonstraram uma correlação positiva entre IL-10 e Foxp3 no grupo CTb.

Gaetano e colaboradores (2011) encontraram diferenças significativas no número de células de pacientes com tuberculose pleural e expressão do Foxp3, sugerindo que pode ser um marcador associado a uma diminuição na regulação da resposta imune contra *M. tuberculosis* e que isto pode contribuir para a sua eliminação mais tardia.

Guyot-Revol et al. (2006) também relatam que as células Tregs estão aumentadas em pacientes com TB e suprimem as respostas imunes celulares. Compararam a freqüência de células Tregs circulantes de pacientes não tratados com TB e controles saudáveis e detectaram um aumento 3 vezes maior na frequencia de células CD4⁺ CD25 e 2 vezes maior na expressão do Foxp3 nos pacientes com TB, existindo uma correlação positiva entre estas células e este marcador, e uma “marca” relacionada com o aumento do Foxp3 em indivíduos com TB. Podemos sugerir que esta relação não tenha sido verificada em nosso grupo devido a ausência de indivíduos com TB ativa.

O gene Foxp3 codifica a proteína FOXP3 que é um fator de transcrição, com a função de aumentar ou suprimir a transcrição de genes específicos. Acredita-se que o fator Foxp3 exerce funções efetora e facilitadora sobre os genes de proteínas chaves na ativação celular. A associação dos níveis das citocinas estudadas com a expressão do Foxp3 nos indivíduos avaliados em nosso trabalho confirma os dados da literatura (CHURINA et al., 2012). Estes referem à redução no número de linfócitos T com o fenótipo CD4⁺ CD25⁺ Foxp3 em todas as formas clínicas da tuberculose pulmonar (CHURINA et al., 2012).

Em nosso estudo, entre o NO produzido e a expressão de Foxp3 foi observada correlação negativa no período de 48 horas no grupo CTb e no grupo STb a mesma correlação no tempo de 24 horas. Embora nenhuma diferença estatística na expressão do marcador Foxp3 tenha sido encontrada entre os grupos analisados, podemos destacar os resultados das correlações. No grupo CTb, encontrou-se correlação positiva do Foxp3 com a IL-10 e correlação negativa com o NO, ambas no tempo de 48 horas. Esses achados sugerem uma dinâmica entre esses marcadores de resposta imunológica, e que estudos com populações de comunicantes e pacientes podem esclarecer cada vez mais o papel desses produtos solúveis e do marcador molecular como elementos fundamentais na manutenção do estado de saúde dos indivíduos expostos ao *M.tuberculosis* (LEE et al., 2011; RAHMAN et al., 2009).

No presente estudo encontramos uma produção similar das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 e de NO e da expressão do Foxp3 nos grupos estudados. Nossos resultados indicam que esses perfis podem favorecer um aparente equilíbrio no que diz respeito à resposta imune frente ao estímulo pelo *M. tuberculosis*. Desta forma, talvez ambas as respostas, Th1 e Th2, sejam importantes para a resposta imune do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*. Os resultados que verificamos confirmam dados prévios que sugerem que a manutenção da memória imunológica com produção efetiva de citocinas regulatórias e protetoras em indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* é fundamental para resposta imunológica nesses indivíduos (ZUNIGA et al., 2012; CAMPBELL & ZIEGLER, 2007; MELO & CARVALHO, 2009).

Nesse sentido destacamos, embora sem diferenças significativas, a correlação negativa entre IL-10 e TNF- α no período de 24 horas de cultivo no grupo STb e a correlação positiva entre NO e TNF- α no mesmo grupo durante 24 horas de cultivo e no tempo de 48 horas de cultivo com AgTb. E que em relação ao grupo CTb, encontramos correlação positiva no tempo de 48 horas de cultivo entre o NO e IFN- γ e

também entre o IFN- γ e TNF- α . Baseados nesses achados podemos ressaltar o papel do TNF- α no estágio de saúde dos indivíduos, sugerindo que essa citocina estaria funcionando como um fator importante, uma vez que a IL-10 apresentou índices altos quando comparados com IFN- γ . Um fator importante que pode ter limitado o poder de avaliação estatística, portanto, não revelando potenciais diferenças do presente estudo, foi o tamanho da amostra.

Baseados nos achados de correlação podemos supor que entre os indivíduos analisados, o NO apresentou um perfil adequado com o estado protetor associado a esse mediador. Então podemos sugerir que entre os dois grupos analisados o NO e Foxp3 se apresentaram de modo semelhante no que diz respeito à dinâmica de suas funções em indivíduos expostos ao antígeno do MTb (BRAHMACHARI & PAHAN, 2009; HERBST et al., 2011).

Estudos em comunicantes intradomiciliares avaliando os perfis de produção de citocinas e o histórico de doença ainda são escassos. Portanto, tornam-se essenciais mais investigações nesse sentido. Ensaios posteriores, que venham esclarecer maiores detalhes a respeito da imunorregulação dessas citocinas em grupos de indivíduos comunicantes, podem confirmar que nesses indivíduos a produção de citocinas é mantida em níveis suficientes para o não desenvolvimento da doença.

Considerando a semelhança em exposição e a capacidade individual de responder ao contato com *M. tuberculosis*, o presente estudo vem contribuir para a compreensão da dinâmica imunológica em indivíduos que convivem com pacientes TB.

7. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos na avaliação da produção das citocinas INF- γ , TNF- α e IL-10; do NO e da expressão do Foxp3 em PBMCs de comunicantes com e sem história de tuberculose pulmonar concluiu-se que:

- 1) A produção de IL-10, IFN- γ e de Óxido Nítrico indicam que os indivíduos com e sem história prévia de tuberculose pulmonar produziram uma resposta celular específica; porém, sem valores que possam indicar uma maior ou menor susceptibilidade à doença.
- 2) Na população estudada, a citocina TNF- α , possivelmente funciona como um elemento fundamental para a manutenção do estado de saúde dos comunicantes;
- 3) A expressão do marcador Foxp3 não está associada diretamente a uma maior predisposição nos indivíduos com história de tuberculose pulmonar;
- 4) As correlações encontradas entre o marcador Foxp3, IL-10 e NO sugerem uma modulação entre esses marcadores de resposta imunológica na população estudada.

8. BIBLIOGRAFIA

- AL-ATTIYAH R., EL-SHAZLY A., MUSTAFA AS. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. **Clinical Immunology**. 75(6): 623-632, 2012.
- ALMEIDA AS, LAGO PM, BOECHAT N, HUARD RC, LAZZARINI LC, SANTOS AR, NOCIARI M, ZHU H, PEREZ-SWEENEY BM, BANG H, ET AL. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. **The Journal of Immunology**. 183: 718–731, 2009.
- ALLEN JE, MAIZELS RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nat Rev Immunol**; 11:375-388, 2011.
- AKHTAR S, WHITE F, HASAN R, ROZI S, et al. Hyperendemic pulmonary tuberculosis in peri-urban areas of Karachi, Pakistan. **BMC Public Health**, v.7(70), p. 1-8, 2007.
- ANDERSEN P & SMEDEGAARD B. CD4+ T-Cell Subsets that mediate immunological memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Infection and Immunity**; 68(2): 621-629, 2000.
- ANDRADE MRM, AMARAL EP, RIBEIRO SCM, et al. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiology**, v. 12(1), 2012.
- ANDREW SM, MARIA IA, EDWARD JP. Immunology of parasitic Helminth Infections. *Infection and Immunity*, Feb: 427-433, 2002.
- ARNOLD, C. et al. Molecular **Evolution of Mycobacterium tuberculosis**. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n.2, p 120-128, 2006.
- AWOMOYI AA, MARCHANT A, HOWSON JM, MCADAM KP, BLACKWELL JM, NEWPORT MJ. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. **J Infect Dis.**; 186(12): 1808-14, 2002.
- BABU S, BHAT SQ, KUMAR NP, et al. Attenuation of Toll-Like Receptor Expression and Function in Latent Tuberculosis by Coexistent Filarial Infection with Restoration Following Antifilarial Chemotherapy. **PLoSOne**, v. 30 (7), e489, 2009.

BABU S., BHAT S. Q., KUMAR N. P., LIPIRA A. P., KUMAR S., KARTHICK C., KUMARASWAMI V., NUTMAN T. B.. Filarial lymphedema is characterized by antigen-specific Th1 and Th17 proinflammatory responses and a lack of regulatory T cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**;3:1–9, 2009.

BAI X, WILSON SE, CHMURA K, FELDMAN NE, CHAN ED. Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*; 84(6):375-85, 2004.

BALANDINA A, LECART S, DARTEVELLE P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. **Blood**;105:735–741, 2005.

BALIZA M, BACH A H, QUEIROZ G L, MELO I C, CARNEIRO M M, ALBUQUERQUE M F P M, SUFFYS P, RODRIGUES L, XIMENES R, LUCENA-SILVA N. High frequency of resistance to the drugs isoniazid and rifampicin among tuberculosis cases in the City of Cabo de Santo Agostinho, an urban area in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; v.41(1), p.11-16, 2008.

BARNES PF, LU S, ABRAMS JS, WANG E, YAMAMURA M, MODLIN RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 61: 3482-3489, 1994.

BATRA S, AYAZ A, MURTAZA A, AHMAD HASAN PFAU R. Childhood Tuberculosis in Household contacts of Newly diagnosed tb patients. **PLoSOne**, v. 7 (7), 1-3, 2012.

BEAMER GL, FLAHERTY DK, ASSOGBA BD, STROMBERG P., GONZALEZ-JUARRERO M., MALEYFT RW, VESOSKY B., TURNER J. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. **J Immunol.** 181(8):5545-50, 2008.

BEAN AGD, ROACH DR, BRISCOE H, FRANCE MP, KORNER H, SEDGWICK JD, BRITTON WJ. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene – targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol.* 162: 3504-3511, 1999.

BECERRA M, PACHAO-TORREBLANCA I, BAYONA J, CELI R. et al. Expanding Tuberculosis Case Detection by Screening Household Contacts. **Reseach Articles**, v. 120, p. 271-277, 2005.

BEKKER LG, MOREIRA AL, BERGTOLD A, FREEMAN S, RYFFEL B, KAPLAN G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. **Infect Immun**; 68: 6954-6961, 2000.

BELKAID, Y. Regulatory t cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews**, v. 7, p. 875-887, 2007.

BORKOW G, WEISMAN Z, LENG Q, STEIN M, KALINKOVICH A, et al. Helminths, human immunodeficiency virus and tuberculosis. **Scan j Infect Dis**, 33: 568-571, 2001.

BOUSSIOTIS VA, TSAI EY, YUNIS EJ, THIM S, DELGADO JC, DASCHER CC, BEREZOVSAYA A, ROUSSET D, REYNES JM, GOLDFELD AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **J Clin Invest.**; 105(9): 1317-25, 2000.

BRAHMACHARI S & PAHAN K. Suppression of regulatory T cells by IL-12p40 homodimer via nitric oxide. **J. Immun.**; 183(3), 2045-2058, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância Epidemiológica**. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília: MS, 2004.

CAMPBELL DJ, ZIEGLER SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nat Rev Immunology**, v. 7(4), p. 305-310, 2007.

CAMPOS HS. Etiopatogenia da Tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**; 15 (1): 29-35, 2006.

CARSWELL, E.A., OLD, L.J., KASSEL, R.L. GREEN, N. FIORE, AND B. WILLIAMSON. An endotoxin- induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** .72, 3666–3670, 1975.

CARVALHO ACC, KRITSKI AL, RUFFINO-NETTO A. Investigação dos contatos de pacientes com tuberculose pulmonar: prioridade e conduta. **Pulmão**; 11(2): 95-101, 2002.

CASANOVA JL & ABEL L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. **Annu Rev Immunol.**;20:581-620, 2002.

CHAN ED, MORRIS KR, BELISLE JT, HILL P, et al. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase-NO_Z by Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* Is Mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF-κB Signaling Pathways. **Infection and Immunity**; v. 69(4); 2001-2010, 2001.

CHEGOU NN, BLACK GF, KIDD M, VAN HELDEN PD, WALZL G. Host markers in Quantiferon supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report. **BMC Pulm. Med.** 9(1), 21, 2009.

CHEGOU NN, BLACK GF, LOXTON AG, STANLEY K et al. Potential of novel *Mycobacterium tuberculosis* infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. **BMC Infection Disease**; v. 12 (10): 1-14, 2012.

CHURINA EG, URAZOVA OI, NOVITSKIY VV. The role of Foxp3-expressing regulatory T Cells and T helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis Research an Treatment**, p. 1-9, 2012.

CLEMENTS DL, HORWITZ MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **Journal Exp Med**, v.181, p. 257-270, 1995.

COOKE GS, HILL AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nat Rev Genet.** 2(12):967-77, 2001.

COOPER AM, DALTON DK, STEWART TA, GRIFFIN JP, RUSSEL DG, ORNE IM. Disseminated tuberculosis in interferon-γ gene- disrupted mice. **J. Exp. Med.**; 178: 2243- 2247, 1993.

COOPER AM, KHADER SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev.* v.226, p.191-204, 2008.

COSTA JT, SILVA R, SÁ R, CARDOSO MJ, RIBEIRO C, NIENHAUS A. Comparison of interferon-gamma release assay and tuberculin test for screening in healthcare workers. *Rev Port Pneumol.* 16(2):211-21, 2010.

D'ANDREA A, ASTE-AMEAZAGA M, VALIANTE NM, MA X, KUBIN M, TRINCHIERI G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon- γ production by suppressing natural killer cells stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 178:1041-1048, 1993.

DANVIDER PSD, MUSTAFA B, MILLINGTON KA. Novel *M tuberculosis* Antigen-Specific T-Cells Are Early Markers of Infection and Disease Progression. *PLoSOne*, 6(12), 2011.

DE WAAL MALEYFT., R, YSSEL H, DE VRIES J. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 150(11):4754-65, 1993.

DEMISSIE A, M. ABEBE A, ROOK AG, et al. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. *J. Immunol.* 172:6938-6943, 2004.

DENNIS M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: Killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leukocyte Biology*; 49: 380-7, 1991.

DHINGRA VK, RAJPAL S, AGGARWAL N, TANEJA DK. Tuberculosis Trend among Household contacts of Tb patieits. *Indian Journal of Community Medicine*; v. 29(1), 44-48, 2004.

DINARELLO C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550, 2009.

DIEL R, ERNST M, DOSCHER G, VISURI-KARBE L et al. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test. *Eur. Respir. J.* v. 28: 16-23, 2006.

DINARELLO CA. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. **European Journal of Immunology**; v. 40(3), 599-606, 2010.

DLUGOVITZKY D, BAY ML, RATENI L, URÍZAR L, RONDELLI CF, LARGACHA C, FARRONI MA, MOLTENI O, BOTTASSO OA. In vitro synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement. **Scand J Immunol**; 49(2): 210-7, 1999.

DLUGOVITZKY D, TORRES-MORALES A, RATENI L, FARRONI MA, LARGACHA C, MOLTENI O, BOTTASSO O. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. **FEMS Immunol Med Microbiol**; 18(3): 203-7, 1997.

DLUGOVITZKY D, BAY ML, RATENI L, FIORENZA G, VIETTI L, FARRONI A, BOTASSO OA. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 122, p. 343-349, 2000.

EHLERS S, BENINI J, HELD H, ROECK C, ALBER G, UHLIG S. Alphabeta T-cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of Mycobacteria-induce pulmonary immunopathology. **J. Exp. Med**: 194: 1847-1859, 2001.

ELIAS D, AKUFFO H, PAWLOWSKI A, HAILE M, SCHON T, BRITTON S. Schistosoma mansoni infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, 23 (11): 1326-1334, 2005.

ELIAS, D., BRITTON, S., ASEFFA, A., ENGERS, H, AKUFFO, H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-beta production. **Vaccine**, 26 (31): 3897-3902, 2008.

FANG FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J Clin Invest**; 99(12): 2818-25, 1997.

FENTON MJ, VERMEULEN MW, KIM S, BURDICK M, STRIETER RM, KORNFELS H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**; 65: 5149-5156, 1997.

FENTON MJ, VERMEULEN MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infection and Immunity*. v64, p.683-90, 1996.

FIORENTINO, D.F., BOND, M.W., MOSMANN, T.R.. Twotypes of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081–2095, 1989.

FIÚZA DE MELO FA, AFIUNE JB. Tuberculose, uma doença ocupacional: infecção, adoecimento e proteção dos profissionais da saúde a serviço de atenção à tuberculose. **Boletim de Pneumologia Sanitária**; 1: 56-58, 1995.

FLANAGAN KL, LEE EA, GRAVENOR MB, REECEWH, URBAN BC, DOHERTY T, BOJANG KA, PINDER M, HILL AV, PLEBANSKI M. Unique T cell effector functions elicited by *Plasmodium falciparum* epitopes in malaria-exposed Africans tested by three T cell assays. *Journal of Immunolgy*. 167(8): 4729-37, 2001.

FLESCH IEA, HESS JH, HUANG S, AGUET M, ROTHE J, BLUETHMANN H, KAUFMANNS SH. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon- γ and tumor necrosis factor α . *J. Exp Med*; 181: 1615-1621, 1995.

FLYNN, JL, CHAN J, TRIELBOLD KJ, DALTON DK, STEWART TA, BLOOM BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.*; 178: 2249-2254, 1993.

FLYNN JL & CHAN J. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*; 19: 93-129, 2001.

FLYNN JL & ERNEST JD. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol*; 12(4): 432-436, 2000.

FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, CHAN J, TRIEBOLD KJ, PFERFFER K, LOWENSTEIN LJ, ET AL. Tumor necrosis factor - α , is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*; 2: 561- 72, 1995.

FLYNN JL, SCANGA CA, TANAKA KE AND CHAN J. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J. Immunol*. 160: 1796-1803, 1998.

FLYNN JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis*; 84: 93-101, 2004.

FULTON SA, CROSS JV, TOOSSI ZT, BOOM WH. Regulation of interleukin-12 by interleukin-10, transforming growth factor-beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gama in human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Infect Dis.*, v. 178, p. 1105-1114, 1998.

GAETANO C, LASAGMA L, CASALINI AG, et al. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in the Parietal Pleura of Patients with Tuberculous Pleurisy. *PLoSOne*, v. 6(7), p. 1-17, 2011.

GALESI VMN. Internação por tuberculose no século XXI: o caso do Município de São Paulo. **Tese de doutorado**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.

GARLANDA C et al. Damping excessive inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *J. Immunol.* 179, 3119–3125, 2007.

GULER, R. Blocking IL-1a but not IL-1b increases susceptibility to chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Vaccine* 29, 1339–1346, 2011.

GAZETA CE, SANTOS MLSG, VENDRAMINI SHF, POLETTI NAA, PINTO NETO JM, VILLA TCS. Controle de Comunicantes de Tuberculose no Brasil: revisão de literatura (1984- 2004). **Revista Latino-americana de Enfermagem**; 16(2): 1-8, 2008.

GAZETA CE. Controle dos comunicantes de doentes de tuberculose: ações realizadas no programa de controle da tuberculose, no município de São José do Rio Preto-SP. **Tese de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. São Paulo, 2004.

GOPINATH R, OSTROWSKI M, JUSTEMENT SJ, FAUSI AS, NUTMAN TB. Filarial infections increase susceptibility to human immunodeficiency virus infection in peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Journal Infection Disease*; 182(6):1804-8, 2000.

GREEN AM, MATTILA JT, BIGBEE CL, BONGERS KS, LIN PL, FLYNN JL. CD4(+) regulatory T cells in a cynomolgus macaque model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Dis.*, V. 202(4), p.533-41, 2010.

GUPTA A., KAUL A., TSOLAKI AG., KISHORE U., BHAKTA S. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 217: 363-374, 2012.

GUYOT-REVOL V, INNES JA, HACKFORTH S, HINKS T, LALVANI A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.**; v.173, p.803-10, 2006.

HARARI A, ROZOT V, ENDERS FB, PERREAU M, et al. Dominant TNF- α -Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nature Medicine**; v. 17 (3): 372-376, 2011.

HARRINGTON, L.E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper 1 and 2 lineages. **Nat. Immunol.** 6: 1123–1132, 2005.

HENAO MI, MONTES C, PARÍS SC, GARCÍA LF. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**; 86(1): 11-9, 2006.

HERZMANN C, ERNST M, EHLERS S, et al. Increased frequencies of pulmonary Treg cells in latent *M. tuberculosis* infection. **European Respiratory Society**; doi:10.1183/090031936.00214611, 2012.

HESSELING AC, MANDALAKAS AM, KIRCHNER HL et al. Highly discordant T cell responses in individuals with recent exposure to household tuberculosis. **Thorax** 64(10), p.840-846, 2009.

HIBBS JBJR, TAINTOR R, VAVRIN Z, RACHLIN E. Nitric Oxid: a cytotoxic activated macrophages effector molecule. **Bioch Biophy Res Commun**; 157(1): 87-94, 1988.

HILL PC, OTA MOC. Tuberculosis case-contact research in endemic tropical settings: design, conduct, and relevance to other infectious diseases
The Lancet Infectious Diseases, V. 10(10), p.723-732, 2010.

HOFFMAN WA, et al. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **J. publ. Hlth Trop. Méd.**, 9: 283-298, 1934.

HOUGARDY J-M, PLACE S, HILDEBRAND M, DROWART A, DEBRIE A-S, LOCHT C, MASCART F. Regulatory T cells depress Immune Response to Protective Antigen in Active Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine**; 176: 409-416, 2007.

HUAN J, CULBERTSON N, SPENCER L, et al. Decreased Foxp3 levels in multiple sclerosis patients. **J Neurosci Res.**;81:45–52, 2005.

HUEBNER RE, SCHEIN MF, BASS JB JR. The tuberculin skin test. **Clin Infect Dis.**; 17(6):968-75, 1993.

ISAACS A. & LINDENMANN J. Virus interference. II. Some properties of interferon. Proc. R Soc. Lond. B Biol. 147(927):268-73. 1957.In: Thomson & Lotze. **The Cytokine Handbook**. 4 edição, vol. 1.

INCE MN, ELLIOTT DE, SETIAWAN T, BLUM A, METWALI A, WANG Y, URBAN JF, JR., WEINSTOCK JV. Heligmosomoides polygyrus induces TLR4 on murine mucosal T cells that produce TGF-beta after lipopolysaccharide stimulation. **J.Immunol** ;176:726–729, 2006.

JONNA I, MEKONNEN M, ABATE E, et al. Resistance to First-Line Anti-TB Drugs Is Associated with Reduced Nitric Oxide Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**. 2012;7(6):e39891. Epub 2012 Jun 29.

JOUANGUY E, ALTAIRE F, LAMHAMEDI S, REVY P, EMILE JL, NEWPORT MJ, LEVIN M, BLANCHE S, SEBOUN E, FISCHER A, CASANOVA JL. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacilli Calmette-Guerin infection. **N Engl J Med**; 335: 1956-1961, 1996.

JUÁREZ E, CARRANZA C, HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ F, LEÓN-CONTRERAS JC, HERNÁNDEZ-PANDO R, ESCOBEDO D, TORRES M, SADA E. NOD2 enhances the

innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans.
Eur J Immunol. 42(4):880-9, 2012.

KADER M , WANG X , PIATAK M , LIFSON J ,et al. $\alpha 4^+ \beta 7^{hi}$ CD4 $^+$ memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection.
Mucosal Immunology ; 2, 439–449, 2009.

KALINKOVICH, A., et al. Decrease CD4 and increased CD8 counts with T-cell activation is associated with chronic helminth infection. **Clin. Exp. Immunol.** 114:414–421, 1998.

KATRIN D. M-B, ANDRADE BB, BARBER DL, HIENY S, FENG CG, CASPAR P, OLAND S, GORDON S, SHER A. Innate and Adaptive Interferons Suppress IL-1a and IL-1b Production by Distinct Pulmonary Myeloid Subsets during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Immunity**, 35, 1023–1034, 2011.

KHADER S A, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4 $^+$ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nature Immunology**, 8(4): 3469-377, 2007.

KINJO Y, KAWAKAMI K, UEZU K, YARA S, MIYAGI K, KOGUCHI Y, HOSHINO T, OKAMOTO M, KAWASE Y, YOKOTA K, YOSHINO K, TAKEDA K, AKIRA S, SAITO A. Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40. **J Immunol.**; 169(1): 323-9, 2002.

KRISTSK AL, CONDE MB, SOUZA GRM. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 2 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2000.

KUCZMA M, PODOLSKY R, GARGE N, DANIELY D. Foxp3-deficient regulatory T cells do not revert into conventional effector CD4 $^+$ T cells but constitute a unique cell subset. **Journal of Immunology**, v. 183(6), 3731-3741, 2009.

LADEL CH, SZALAY G, RIELDEL D, KAUFMANN SHE. Interleukin – 12- secretion by *Mycobacterium tuberculosis* – infected macrophages. **Infect Immun**; 65: 1936-1938, 1997.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**; 227:680-685, 1970.

LALVANI A, PATHAN AA, DURKAN H, WILKINSON KA, WHELAN A, DEEKS JJ, REECE WH, LATIF M, PASVOL G, HILL AV. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. **Lancet.**; 357(9273):2017-21, 2001.

LEE E, HOLZMAN RS. Evolution and current use of the tuberculin test. **Clin Infect Dis.**; 34(3):365-70, 2002.

LEE S-W, CHOI H, EUN S-Y, et al. Nitric Oxide Modulates TGF- β -Directive Signals To Suppress Foxp3+ Regulatory T Cell Differentiation and Potentiate Th1 Development. **J. Immun.**; v. 186(12): 6972-6980, 2011.

LEEPIYASAKULCHAI C, IGNATOWICZ L, PAWLOWSKI A, et al. Failure To Recruit Anti-Inflammatory CD103_ Dendritic Cells and a Diminished CD4_ Foxp3_ Regulatory T Cell Pool in Mice That Display Excessive Lung Inflammation and Increased Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**; v. 80(3); 1128-1139, 2012.

LEMOS ACM. Prevalência e risco de tuberculose em contatos domiciliares. **Tese** (Doutorado em Medicina Interna) - Faculdade de Medicina, Universidade federal da Bahia, Salvador, 2001.

LEMOS AC, MATOS ED, PEDRAL-SAMPAIO DB, NETTO EM. Risk of Tuberculosis among household contacts in Salvador, Bahia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**; 8(6): 424-430, 2004.

LIN, P L and FLYNN J. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. **The Journal of Immunology**, 185: 15–22, 2010.

LIN Y, ZHANG M, HOFMAN FM, GONG J, BARNES PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. **Infect. Immun.**; 64: 1351-1356, 1996.

LUCENA-SILVA N, BALIZA MD, MARTINS AES, DEGHAIDE NHS, et al. Relatedness and HLA-DRB1 typing may discriminate the magnitude of the genetic susceptibility to tuberculosis using a household contact model. **J Epidemiol Community Health**; doi:10.1136/jech.2008.08601, 2010.

MAIZELS RM, HEWITSON JP, SMITH KA. Susceptibility and immunity to helminth parasites. **Current Opinion in Immunology**, 24: 459-466, 2012.

MAINI RN, TAYLOR PC, PALEOLOG E, CHARLES P, BALLARA S, BRENNAN FM, FELDMANN, M. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 58: I56-I60, 1999.

MCDYER JF, HACKLEY MN, WALSH TE, COOK JL, SEDER RA. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T cell counts have impaired Th1 responses. **The Journal of Immunology;** 492-500, 1997.

MARSON A, KRETSCHMER K, FRAMPTON GM, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. **Nature,** 445(7130), p.931-5, 2007.

MARTIN I V, BARTEK IL, VISCONTI K, SCHOOLNIK GK. The Response of *Mycobacterium Tuberculosis* to Reactive Oxygen and Nitrogen Species **Front Microbiol.**; 2: 105, 2011.

MARTIN I V, BARTEK IL, Kevin Visconti, Gary K. Schoolnik. The Response of *Mycobacterium Tuberculosis* to Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Front Microbiol.**; 2: 105, 2011.

MELO KM & CARVALHO BTC. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Rev. Bras. Aler. Imunopatol.** 32(5): 184-188, 2009.

MOHAN VP, SCANGA CA, YU K, SCOTT HM, TANAKA KE, TSANG E. Effects of tumor necrosis factor - α on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect Immun;** 69: 1847-55, 2001.

MOURA EP. Avaliação da resposta immune celular e humoral antes e depois do tratamento da tuberculose pulmonar. **Tese;** 90 pg, 2002.

MOUTINHO I L D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais** 21 (1): 42-48, 2011.

MURRAY PJ & YOUNG RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun;** 67(6): 3087-3095, 1999.

NATHAN C & SHILOH MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **PNAS;** 97(16): 8841-8848, 2000.

NEWPORT MJ, HUXLEY CM, HUSTON S, HAWRYLOWICZ CM, OOSTRA BA, WILLIAMSON R, LEVIN M. An mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. **N. Engl J. Med.**; 335: 1942-1949, 1996.

NICHOLSON S, BONECINI-ALMEIDA MDG, LAPA E SILVA JR, NATHAN C, XIE Q-W, MUMFORD R, WEIDNER JR, CALACAYCAY J, GENG J, BOECHAT N. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J Exp. Med.**; 183: 2293-2302, 1996.

NIEDBALA W, CAI B, LIU H, PITMAN N, CHANG L, LIEW FY. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 104(39): 5478-83 2007.

NIENHAUS A, SCHABLON A, DIEL R. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection--analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test. **PLoS One**. 3(7):e2665,2008.

NORTH RJ & JUNG YJ. Immunology of Tuberculosis. **Annu Rev Immunology**; 22: 599-632, 2004.

OBERHOLZER A, OBERHOLZER C, MOLDAWER LL. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. **Crit Care Med**; 28: 3-12, 2000.

OKAMOTO M, HASEGAWA Y, HARA T, HASHIMOTO N, IMAIZUMI K, et al. T-Helper Type 1/T-Helper Type 2 Balance in Malignant Pleural Effusions Compared to Tuberculous Pleural Effusions. **CHEST**; 128(6), 4030-4035, 2005.

OLOBO JO, GELETU M, DEMISSIE A, EGUALE T, HIWOT K, ADERAYES G, BRITTON S. Circulating TNF- α , TGF- β and IL-10 in Tuberculosis Patients and Healthy Contacts. **Scand. J. Immunol**; 53: 85-91, 2001.

OTTENHOFF THM, VERRECK FAW, HOEVE A, VAN DE VOSSE E. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**; 85: 53-64, 2005.

PAIS TF, SILVA RA, SMEDEGAARD B, APPELBERG R, ANDERSEN P. Analysis of T cells recruited during delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) versus challenge with tuberculosis infection. **Immunology**; 95(1): 69-75, 1998.

PARK H, LI Z, YANG X O, CHANG S H, NURIEVA R, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *6* (11): 1133-1141, 2005.

PEREIRA MG. Epidemiologia: teoria e prática. Rio de Janeiro **Ed Guanabara Koogan**, 1999. 598 p.

PEREIRA CB, PALACI M, LEITE OHM, DUARTE AJS, BERNARD G. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations. **Microbes and Infection**; 6: 25-33, 2004.

PIORIER V & AV-GAY Y. *Mycobacterium tuberculosis* modulators of the macrophage's cellular events. **Microbes and Infection**; 14 (13): 1211-1219, 2012.

POVEDA F, CAMACHO J, ARNALICH F, CODOCÉO R, DEL ARCO A, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ P. Circulating cytokine concentrations in tuberculosis and other chronic bacterial infections. *Infection*; 27(4-5): 272-4, 1999.

PRABHA C, JALAPATHY KV, MATSA RP, DAS SD. Differential T helper cell response in tuberculous pleuritis. **Indian J Med Microbiol**; 25(1): 18-23, 2007.

RAHMAN S, GUDETTA B, FINK J, GRANATH A, et al. Few CD8+ Effector T Cells but Elevated Levels of FoxP3+Regulatory T Cells in the Granulomatous Lesions. **Immunopathology and Infectious Diseases**; 174(6): 2211-2224, 2009.

RAJA A. Immunology of tuberculosis. **Indian J Med Res**; 120: 213-232, 2004.

READ SM, NORTHCOTE DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G - binding assay for protein. **Analytical Biochemistry** 116: 53-64, 1981.

REDFORD PS, MURRAY PJ, O'GARRA A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. **Mucosal Immunol**; 4:261-270, 2011.

REDE TB. Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose. <http://www.redetb.org.br/a-historia-da-tuberculose>. acessado em 10/ 06/2012.

REECE ST, STRIDE N, OVENDALE P, REED SG, CAMPOS-NETO A. Skin test performed with highly purified *Mycobacterium tuberculosis* recombinant protein triggers tuberculin shock in infected guinea pigs. **Infect Immun.**;73(6): 3301-6, 2005.

RESENDE CO T, HIRSCH CS, TOOSI Z et al., Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti- *Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. **Clin Exp Immunol**; 147: 45-52, 2007.

RIBEIRO-RODRIGUES R, RESENDE CO T, ROJAS R, TOOSSI Z, DIETZE R, BOOM WH, MACIEL E, HIRSCH CS. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol**; v. 144, p.25-34, 2006.

ROJAS RE, BALAJI KN, SUBRAMANIAN A, BOOM WH. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. **Infect Immunology.**; v. 67(12), p. 6461-72, 1999.

ROOK GA. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. **Curr Mol Med**; 7:327-337, 2007.

ROUQUAYROL MZ, ALMEIDA FILHO N. Epidemiologia e Saúde. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009, p. 736.

SALGAME P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current Opinion in Immunology**; 17:374-380, 2005.

SANDHU G, BATTAGLIA F, ELY BK, ATHANASAKIS D, et al. Discriminating active from latent tuberculosis in patients presenting to community clinics. **PLoSOne**. V.7(5), e38080, 2012.

SÁNCHEZ FO, RODRIGUEZ JI, AGUDELO G, GARCIA LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. **Infection and Immunity**; 62 (12): 5673-5678, 1994.

SCANGA AC, MOHAN VP, YU K, JOSEPH H, TANAKAK, CHAN J, FLYNN JL. Depletion of CD4+T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon- γ and nitric oxide synthase 2. **J. Exp. Med**; 192: 347-358, 2000.

SCHAECHTER MN, ENGLEBERG NC, EISENSTEIN BI, MEDOFF G. Microbiologia-Mecanismos das Doenças Infecciosas. 3^a Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, 642p.

SCHANDENE, L. ALONSO-VEGA C, WILLEMS F, GÉRARD C, DELVAUX A, VELU T, DEVOS R, DE BOER M, GOLDMAN M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J. Immunol.* 152, 4368–4374, 1994.

SELIG L, KRISTKI AL, CASCÃO AM, BRAGAJU, TRAJMAN A, CARVALHO RMG. Proposta de vigilância de óbitos por tuberculose em sistemas de informação. Rev. Saúde Pública [online], v.44, n.6, p. 1072-1078, 2010.

SERBINA NV, FLYNN JL. Early emergence of CD8+ T cells printed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*- infected mice. *Infect. Immun.* 67:3980-3988, 1999.

SHAMS H, WIZEL B, WEIS SE, SAMTEN B, BARNES PF. Contribution of CD8(+) T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. *Infection Immunology*; 69(5):3497-501, 2001.

SHARMA SK, MITRA DK, BALAMURUGAN A, PANDEY RM, MEHRA NK. Cytokine polarization in miliary and pleural tuberculosis. *J Clin Immunol* 22: 345–352, 2002.

SHARMA PK, SAHA PK, SINGH A, SHARMA SK, et al. FoxP31 Regulatory T Cells Suppress Effector T-Cell Function at Pathologic Site in Miliary Tuberculosis. *American Journal of respiratory and critical care medicine*; v. 179; 1062-1070, 2009.

SHIN HD, PARK BL, KIM YH, CHEONG HS, LEE IH, PARK SK. Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp. Mol. Med.*; 37(2): 128-32, 2005.

SIELING PA, ABRAMS JS, YAMAMURA M, SALGAME P, BLOOM BR, REA TH, MODLIN RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol.*; 150(12): 5501-10, 1993.

SINGH A, DEY AB, MOHAN A, SHARMA PK, MITRA DK. Foxp3(+) Regulatory T Cells among Tuberculosis Patients: Impact on Prognosis and Restoration of Antigen Specific IFN- γ Producing T Cells. **PLoS One**; 7(9):e44728. doi: 10.1371/journal.pone.0044728, 2012.

SINGLETON LRN, TURNER M, HASKAL R, ETKIND S, TRICARICO M, NARDEL E. Long term hospitalization for tuberculosis control. **JAMA**; 278: 838-42, 1997.

SILVA, JRL & BOÉCHAT, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**; 30(4): 478-84, 2004.

SILVER RF, LI Q, ELLNER JJ. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. **Infect Immun.**; 66(3): 1190-99, 1998.

SINAN. Sistema de Informações de Agravos de Notificação. 2012. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>.

SOLOVIC I., M. SESTER, J.J. GOMEZ-REINO, H.L. RIEDER, S. EHLERS, H.J. MILBURN, et al. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. **Eur Respir J**. 36(5): 1185-206, 2010.

SOUZA WV; ALBUQUERQUE MFM; BARCELLOS CC; XIMENES RAA; CARVALHO MS. Tuberculose no Brasil: construção de um sistema de vigilância de base territorial **Revista de Saúde Pública**; 39(1): 82-89, 2005.

STALLMACH A, HAGEL S, BRUNS T. Adverse effects of biologics used for treating IBD. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 24(2): 167-82, 2010.

TALAT N, SHAHID F, PERRY S, DAWOOD G, HUSSAIN R. Th1/Th2 cytometric Bead array can discriminate cytokine secretion from endogenously activated cells in pulmonary disease, recent and remote infection in tuberculosis. **Cytokine**; v. 54(2): 136-143, 2011.

TAVARES RC, SALGADO J, MOREIRA VB, FERREIRA MA, MELLO FC, LEUNG JA, SINGH M, FONSECA LDE S, SAAD MH. Cell proliferation and interferon-gamma

response to recombinant MBP-3, NarL, MT-10.3, and 16 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Brazilian tuberculosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(8):857-61, 2006.

TOMIOKA, H., TATANO, Y., SANO C., SHIMIZU. Development of new antituberculous drugs based on bacterial virulence factors interfering with host cytokine networks. *J. Infect Chemother.* 17: 302-317, 2011.

TORGERSON TR, OCHS HD. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunology*, v.7(6), p. 515-521, 2007.

TORRADO E, COOPER AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor.* 21(6): 455–462, 2010.

TORRES M, HERRERA T, VILLAREAL H, RICH E A, SADA E. Cytokine Profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*; 66: 176-180, 1998.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. Microbiologia. 10^a Edição, Porto Alegre, Editora Artmed, 2012, 934p.

TRABULSI LR, ALTERTHUM F. Microbiologia. 5^a Edição, Rio de Janeiro, Atheneu, 2008, 780p.

TURNER J, GONZALEZ-JUARRERO M, ELLIS DL, BASARABA RJ, KIPNIS A, ORME IM, COOPER AM. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *The Journal of Immunology;* 169: 6343-6351, 2002.

VERHAGEN LM, HERMANS PWM, WARRIS A, GROOT R, et al. Helminths and skewed profiles increase tuberculin skin test positivity in Warao Amerindians. *Tuberculosis*, 30: 1-8, 2012.

WANG CH, LIN HC, LIU CY, HUANG KH, HUANG TT, YU CT, KUO HP. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine secretion in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 5(3), 283-291, 1997.

WANG C-H, LIN H-C, LIU C-Y, HUANG K-H, HUANG T-T, YU C-T, KUO H-P. Upregulation of indecible nitric oxide synthase and cytokine secretion in peripheral

blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. **Int J Tuberc Lung Dis** ; 5(3): 283-291, 2001.

WANG X, BARNES PF, DOBOS-ELDER KM, TOWNSEND JC, et al. ESAT-6 Inhibits Production of IFN- γ by *Mycobacterium tuberculosis*-Responsive Human T Cells. **The Journal of Immunology**; 182(6): 3668-3677, 2009.

WINSLOW GM, ROBERTS AD, BLACKMAN MA, WOODLAND DL. Persistence and turnover of antigen-specific CD4 T cells during chronic tuberculosis infection in the mouse. **J Immunol.**; 170(4):2046-52, 2003.

World Health Organization. **Global Tuberculosis Control**, 2011.

World Health Organization. **The Global Plan Tuberculosis to Stop TB 2011-2015**. 2012.

WOZNIAK TM, SAUNDERS BM, RYAN AA, BRITTON WJ. *Mycobacterium bovis* BCG-specific Th17 cells confer partial protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in the absence of gamma interferon. **Infect. Immun.** 78:4187–4194, 2010.

WU X, HOU W, SUN S, BI E, WANG Y, SHI M, ZANG J, DONG C, SUN B. Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. **J Immunol**; 177(2):934-43, 2002.

WU Y, BORDE M, HEISSMEYER V, et al. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. **Cell**, v. 126(2), p. 375-387, 2006.

YAGI H, NOMURA T, NAKAMURA K, YAMAZAKI S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25 + CD4 + regulatory T cells. **International Immunology**, v. 16 (11), p. 1643-1656, 2004.

YU K, MITCHELL C, XING Y, MAGLIOZZO RS, BLOOM BR, CHAN J. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria *M. tuberculosis* is resistant to peroxynitrite anion. **Tuber Lung Dis**; 79: 191-198, 1999.

ZHANG M, GONG J, IYER DV, JONES BE, MODLIN RL, BARNES PF. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. **J Clin Invest.**; v.94(6), p.2435-42, 1994.

ZHANG M, LIN Y, IYER DV, GONG J, ABRAMS JS, BRANES PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**; 63: 3231-3234, 1995.

ZUNIGA J, TORRES-GARCIA D, SANTOS-MENDOZA T, et al. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**; doi:10.1155/2012/193923, 2012.