



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



CRISTIANE SANTOS NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À PROTEÍNA
MCEP (*MYCOBACTERIUM CELL ENTRY PROTEIN*)
EM INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR**

Salvador - Bahia
1999



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À PROTEÍNA MCEP (*MYCOBACTERIUM CELL ENTRY PROTEIN*) EM INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Professor Orientador: Manoel Barral-Netto

Salvador - Bahia
1999

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N244a Nascimento, Cristiane Santos
Avaliação da resposta imune à proteína mcep (Mycobacterium cell entry protein)
em indivíduos com tuberculose pulmonar [manuscrito] / Cristiane Santos
Nascimento. - 1999.
95 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da
Saúde , 1999

Orientador: Dr. Manoel Barral-Netto. Laboratório de Imunoregulação.

1. Tuberculose pulmonar. 2. Imunologia. I.Título.
CDU 616.24-002.5:577.27



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



**ATA DE REUNIÃO DE BANCA EXAMINADORA PARA DISCUSSÃO E
 JULGAMENTO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Ao vigésimo primeiro dia do mês de dezembro de 1999, às 8:00 horas, na Sala da Congregação, segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores : Dr. Manoel Barral Neto, orientador, Dr. Álvaro Cruz e Dr. Dumith Chequer Bou-Habib, com a finalidade de discutir , avaliar e julgar a Dissertação intitulada: "Avaliação da resposta imune à proteína MCEP (mycobacterium cell entry protein) em indivíduos com tuberculose pulmonar", de autoria da Mestranda **CRISTIANE SANTOS NASCIMENTO**. Foram feitos os comentários pelos examinadores, havendo cumprido as exigências regulamentares à dissertação, a Banca Examinadora conclui que a Mestranda teve sua defesa pública de Dissertação de Mestrado Aprovada.

Nada mais havendo a ser tratado, a Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos, sendo a seguir lavrada a presente ata que após lida e achada conforme, vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora, pela Mestranda e por um representante do Colegiado deste Programa.

Salvador, 21 de dezembro de 1999.

Dr. Manoel Barral Neto

Dr. Alvaro Cruz

Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Cristiane Santos Nascimento

Dra. Maria de Fátima Dias Costa
 Membro do Colegiado

*Receber e com o original
 Sônia Menezes Freire*
 Dra. Sônia Menezes Freire
 Coordenadora
 PPGIM - ICS - UFBA

“O maior dever do homem para consigo próprio, é o de pesquisar e analisar para compreender e praticar para evoluir sentindo todo conhecimento teórico/prático acerca da vida em suas manifestações fenomênicas, que importe para a sua evolução, a do seu semelhante, bem como a do orbe em que habita, bem como ao Universo em sua expansão.”

O Imutabilismo.
O.C.I.D.E.M.NT.E. – 7º C.D.E.

DEDICATÓRIA

A Jackson, Matheus e Carolina com muito amor.

Aos meus Pais, Hulda e Adalberto com gratidão e afeto.

Ao amigo, pai e mentor espiritual, Jair Tércio com amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Manoel Barral, meu orientador, pelos ensinamentos, paciência e estímulo, e, sobretudo, pelo privilégio da convivência profissional e de ser um exemplo da ciência, minha admiração.

À Sérgio Arruda, meu coorientador pelos ensinamentos, amizade e companheirismo nos trabalhos desenvolvidos nesta dissertação.

Ao Dr. Lee Riley por gentilmente ter cedido a proteína MCEP (micobacteria cell entry protein) para que este estudo fosse realizado, meus agradecimentos.

A Dra Glória Bonfim pela minha iniciação na pesquisa científica, orientando-me sempre com muito carinho, dedicação e competência.

A Dra Aldina Barral pela amizade e auxílio nas discussões científicas.

A Dra Elza Vieira (Fundação José Silveira) e ao Dr. Marcelo Chalhoub (HOM) pela excelente colaboração na avaliação clínica dos pacientes que participaram deste estudo.

A Theolis Barbosa, colega e amiga pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais e na discussão científica.

À Marcus Andrade de Paula e a Edvana Passos pelo auxílio nos procedimentos de coletas.

A Sílvia Andrade Cardoso e a Jorge Tolentino pela amizade e auxílio sempre que solicitado por mim no laboratório.

Ao pessoal da Biblioteca do CPqGM pelo auxílio e orientações recebidas durante a obtenção de artigos científicos e correção bibliográfica.

Aos professores que mais se tornaram amigos durante este tempo.

Aos colegas e amigos do Hospital Prof. Edgar Santos- Serviço de Imunologia pelos auxílios prestados com muito carinho e atenção.

Aos pacientes, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (Fundação Oswaldo Cruz - BA), onde foram realizados os experimentos aqui descritos e pelo apoio financeiro com a concessão de bolsa de estudo.

À Coordenação do Mestrado de Imunologia, pelo suporte administrativo ágil, e pronto apoio para a viabilização da apresentação deste trabalho em congresso, bem como da minha participação em eventos científicos relevantes.

À Fundação O.C.I.D.E.M.NT.E. e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse experimento e que não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

Nascimento, Cristiane Santos. Avaliação da resposta imune à *mycobacterium cell entry protein* (MCEP) em indivíduos com tuberculose pulmonar. 95 f. il. 1999. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1999.

RESUMO

[INTRODUÇÃO]. O *Mycobacterium tuberculosis* é responsável por 100.000 novos casos de tuberculose anualmente no Brasil. Diante desta alta incidência, é imperativo a busca de estudos que possam melhor elucidar a interação dos componentes do bacilo com o sistema imune. A resposta imune para muitos componentes do bacilo parece não estar clara. Entre as proteínas que compõe a parede celular do bacilo, algumas tem sido estudada, mas a maioria delas tem sua função ainda desconhecida. Recentemente uma nova proteína do *M. tuberculosis*, MCEP (*Mycobacterium cell entry protein*) foi clonada e sequenciada. MCEP é uma proteína de 52kD que medeia a entrada e sobrevivência do *M. tuberculosis* em células não fagocíticas e em macrófagos humanos. **[OBJETIVO]**. Estudar a resposta imune humoral e celular contra MCEP em indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar. **[GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS]**. Dez indivíduos PPD-, dez PPD+ e dez pacientes com tuberculose pulmonar foram incluídos neste estudo. Foram coletados soro dos indivíduos dos grupos estudados para determinação dos títulos de anticorpos contra MCEP através da técnica de ELISA. As placas foram sensibilizadas com 1 ug/ml do antígeno solúvel de MCEP onde foi incubada e em seguida processada as lavagens e finalizando a detecção através da adição do substrato. Para avaliar a imunidade celular células mononucleares foram isoladas do sangue periférico pelo gradiente de Ficoll-hypaque e cultivados na estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 5 dias na presença do antígeno total do *M. tuberculosis* (1ug/ml), MCEP (1ug/ml), pokeweed mitógeno-PWM (1/100), conA (10ug/ml) e anti-TGF β(10ng/ml). A transformação blástica induzida por MCEP e a sua capacidade de inibir a proliferação celular induzida por ConA foi mensurada por incorporação de H-tymidine. Concentrações de IL-2, IFN_γ, TNF_α, IL-10 e TGFβ foram determinadas nos sobrenadantes pela técnica de ELISA (ENDOGEN). **[RESULTADOS]**. Este estudo demonstra que MCEP induziu baixos níveis de IgG no soro. A proliferação celular em resposta à MCEP foi muito baixa em todos os grupos estudados. A mediana de IL-2 em resposta a MCEP foi de 20 pg/ml, 6pg/ml e 17 pg/ml nos sobrenadantes do grupos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar. A produção de IFN_γ em resposta à MCEP foi de 11pg/ml, 1pg/ml e 5pg/ml e de TNF_α foi de 1pg/ml, 4pg/ml e 58pg/ml nos mesmos grupos estudados. Em adição MCEP induziu concentrações baixas de IL-10. Contudo, MCEP induz uma grande produção de TGFβ em células mononucleares de ambos grupos controles e pacientes avaliados respectivamente 1742pg/ml, 1773pg/ml e 2361 pg/ml. A capacidade de proliferação induzida por ConA foi inibida pela adição de MCEP e revertida pelo

anti - TGF β . **[CONCLUSÕES]**. MCEP foi capaz de induzir IgG total no soro. A capacidade de ativação linfoblástica não foi observada. Não se observou a produção de citocinas ativadoras do sistema imune como IL-2, IFN γ e TNF α nas células mononucleares de todos os grupos estudados. Mcep não induziu produção de IL-10, porém induziu uma alta produção de TGF β nos sobrenadantes dos grupos estudados. MCEP inibiu a capacidade estimulatória de ConA sobre as células mononucleares. Este efeito de MCEP foi mediado por TGF β .

Nascimento, Cristiane Santos. Immune response to mycobacterium entry protein (mcep) in patients with pulmonary tuberculosis. 95 pp. ill. 1999. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1999.

ABSTRACT

BACKGROUND. *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for 100.000 new cases of tuberculosis (Tb) annually in Brazil. Despite the high incidence of this disease, the host immune response to many components of the bacilli remains unclear. Among the proteins that compose the bacteria cell wall, some have been studied, but the majority of them the function completely unknown. Recently a new *M. tuberculosis* protein, MCEP (mycobacterium cell entry protein) was cloned and its DNA was sequenced. MCEP mediates the entry and survival of *M. tuberculosis* in non-phagocytic cells and human macrophages.**GOAL.** To evaluate the immune response of patients with pulmonary tuberculosis, PPD negative and PPD positive subjects to MCEP.**METHODS.** Ten patients with active pulmonary tuberculosis, ten PPD negative and ten PPD positive subjects were included in this study. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood by Ficoll-hypaque gradient and cultured in 5% CO₂, 37°C for 5 days in the presence of crude *M. tuberculosis* antigens (1µg/ml), MCEP (1µg/ml), Pokeweed mitogen (PWM, 1/100) or in the absence of stimuli (UN). Blast transformation was measured by ³H-thymidine incorporation. Levels of TNF-α, IFN-γ, IL-10 and TGF-β were determined in the cell supernatants by ELISA (Endogen).**RESULTS.** This study demonstrated that MCEP induced IgG antibodies in the serum all the groups. Low mononuclear cell proliferation was induced by MCEP in both groups of cells from controls and patients. IL-2 levels induced by MCEP were 20 pg/ml, 6pg/ml e 17 pg/ml in mononuclear cells from PPD-, PPD+ and pulmonary tb patients, respectively. IFN_γ levels induced by MCEP were 11pg/ml, 1pg/ml e 5pg/ml and TNF_α were 1pg/ml, 4pg/ml e 58pg/ml respectively in the same groups. In contrast to other cytokines, MCEP was strongly inducer of TGFβ in mononuclear cells from controls subjects and Tb patient. The TGFβ levels detected were 1742pg/ml, 1773pg/ml and 2361pg/ml in the supernatants of PBMC cells from PPD-, PPD+ and pulmonary tb patients, respectively. In addition MCEP was able to block the conA induced PBMC proliferation. The MCEP inhibitory effect was abrogated by neutralizing antibodies against TGFβ.**CONCLUSIONS.** Mcep induced IgG antibodies. MCEP did not induced activating cytokines, with IL-2, IFN_γ and TNF_α. In addition, MCEP induced low levels of IL-10 in both groups of the controls and patients. Mcep induced TGFβ high levels in all the groups. The inhibitory effect of MCEP in the ConA, was abrogated by neutralizing antibodies against TGFβ.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO:	17
1.1	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	17
1.2.	A RESPOSTA IMUNE AO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	19
1.2.1.	Participação dos macrófagos.....	20
1.2.2.	Participação dos Linfócitos T CD4+.....	22
1.2.3.	Participação dos linfócitos T CD8+.....	23
1.2.4.	Participação das células T $\gamma\delta$	24
1.3.	ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS.....	25
2	OBJETIVOS:	30
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS:	31
3.1.	GRUPO DE ESTUDO.....	31
3.1.1.	Pacientes com Tuberculose Pulmonar.....	31
3.1.2.	Grupo Controle.....	32
3.2.	ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS E MITÓGENOS.....	32
3.3.	DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI- MCEP.....	33
3.4.	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP).....	34
3.5.	TESTE DE TRANSFORMAÇÃO LINFOBLÁSTICA.....	34
3.6.	PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	35
3.7.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	35
3.8.	AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE MCEP (1ug/ml) SOBRE AS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMNSP).....	36
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS:	38
4.1.	AVALIAÇÃO DE IGG TOTAL.....	38
4.2.	RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA.....	38
4.3.	PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	38
4.4.	AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE MCEP (1ug/ml) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMNSP) INDUZIDAS POR ConA.....	40
4.5.	GRÁFICOS.....	42

5	DISCUSSÃO:	50
	5.1. ESQUEMA DE INTERPRETAÇÃO.....	55
6	CONCLUSÕES:	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	57
	PUBLICAÇÃO	70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição Global de casos (doentes) e mortes da tuberculose (WHO, 1997) 19
- Tabela 2.** Distribuição pela idade (média) e sexo dos grupos contoles e pacientes com Tuberculose pulmonar. 32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Níveis de IgG total anti-MCEP e antígeno total do *M. tuberculosis* (Mtb) presente no soro de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar.42
- Figura 2.** Resposta linfoproliferativa de células de indivíduos PPD-, PPD+ e paciente com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP, antígeno total de *M. tuberculosis* (Mtb) e pokeweed (PWM).
IE = Índice de Estimulação.43
- Figura 3.** Produção de IL-2 por células mononucleares de indivíduos PPD-,PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb).44
- Figura 4.** Produção de IFN γ por células mononucleares de indivíduos PPD-,PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb).45
- Figura 5.** Produção de TNF α por células mononucleares de indivíduos PPD-,PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb).46
- Figura 6.** Produção de IL-10 por células mononucleares de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb).47
- Figura 7.** Produção de TGF β por células mononucleares de indivíduos PPD-,PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígenototal do *M. Tuberculosis*(Mtb).48
- Figura 8.** Avaliação do efeito inibitório de MCEP sobre as células mononucleares, após estimulação com ConA.49

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Tbp – Tuberculose pulmonar

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay - (Ensaio Imunoenzimático)

OMS – Organização Mundial de saúde

BCG – Baccille Calmette-Guérin

NK – Células natural Killer

HO – Radicais de oxigênio

IL-2 – Interleucina 2

IL-10 – Interleucina 10

IFN γ - Interferon gama

TNF α - fator de necrose tumoral

TGF β – fator de transformação de crescimento

pg – picogramas

ml – mililitros

PBS Phosphate Buffer Solution - Tampão salina fosfato

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

MCEP - Mycobacterium cell entry protein

PPD - – Indivíduos com teste tuberculínico negativo

PPD+– Indivíduos com teste tuberculínico positivo

PWM – Pokeweed

ConA – Concanavalina A

SOD – Superóxido dismutase

I.B.I.T – Instituto Bahiano para Investigação do Tórax

STF – Salina tamponada

BSA– Soro albumina bovina

I.E – índice de estimulação

CMNSP– Células mononucleares do sangue periférico

[³H timidina] - timidina triciada

1 INTRODUÇÃO:

1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

Em 1882, Robert Koch identificou o *Mycobacterium tuberculosis* como o agente causador da tuberculose humana (KOCH,1932).

Nesta época a Tuberculose era uma doença com altíssima mortalidade, 300/100.000 habitantes na Europa. Com a descoberta de drogas tuberculostáticas e a melhoria das condições de vida, tais como alimentação e assistência médica, as taxas de morbidade e mortalidade devidas a tuberculose foram diminuindo progressivamente(MIDDLEBROOK,1982). Essa diminuição progressiva dos números de casos de Tuberculose, induziu a uma aparente conclusão: que o problema que quase dizimou a população no século XVIII seria brevemente solucionado.

A consequência desta conclusão foi desastrosa, pois houve um abandono das pesquisas tanto do estudo dos mecanismos imunopatológicos como também de novas drogas tuberculostáticas, resultando em um aumento de novos casos de tuberculose. Em muitos países em desenvolvimento, a taxa de incidência permaneceu alta e a tuberculose hoje é responsável por aproximadamente 20% de todas as mortes em adultos (BLOOM & MURRAY, 1992).

Com o surgimento da síndrome de Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) a partir de 1982, e da forte evidência da associação entre o vírus HIV e o *M. tuberculosis*, houve um grande aumento na incidência de Tuberculose em alguns países (MANN et al.,1992). Por causa da habilidade de destruir a

imunidade celular, o vírus HIV é considerado o mais significativo fator de risco na progressão de uma infecção dormente pelo *M. tuberculosis* para uma forma de doença clínica ativa da tuberculose. (HENOKEN et al.,1992). Neste cenário já de descontrole da tuberculose humana, o aparecimento de cepas do *M. tuberculosis* resistentes às drogas (MDR) impõe adicional dificuldade no tratamento da tuberculose.(EDLIN et al.,1992)

Os programas de vacinação por muitos anos acreditavam ser a solução para o problema da tuberculose no Mundo. Atualmente, a única vacina utilizada é o BCG(Bacille Calmette-Guérin). Esta vacina geralmente induz proteção à tuberculose em modelos experimentais (SMITH et al., 1985), porém a eficácia em humanos, permanece controversa. Em alguns locais testados demonstrou-se uma eficácia de aproximadamente 80% dos indivíduos vacinados, no entanto em outras regiões e /ou países observou-se baixos índices de proteção (FINE et al., 1989).

A Organização de Saúde (OMS) avalia que um terço da população mundial está infectada pelo *M.tuberculosis* e destes indivíduos, 5 a 10% poderão desenvolver tuberculose pulmonar ao longo da vida. Sendo que os países mais acometidos são: Afeganistão, Blangladesch, Brasil, China, Congo, Etiópia, India, Indonésia, Iran, México, Nigéria, Paquistão, Peru Filipinas, Rússia, Africa do Sul , Sudão, Tanzânia, Tailândia, Uganda e Vietnã.

A distribuição do número de casos de doentes com tuberculose pode ser observada na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição Global de casos (doentes) e mortes da tuberculose (WHO,1997)

Região	Nºde doentes com tuberculose	Nº de mortes por tuberculose
Sudeste da Asia	2.800.000	1.095.000
Africa	4.650.000	770.000
Pacífico Ocidental	4.583.000	594.000
Américas	448.000	160.000
Mediterrâneo	427.000	173.000
Europa	342.000	118.000
Total	7.249.000	2.908.000

Na ausência de uma ação imediata para o controle da Tuberculose nesses países, A OMS prevê que para as próximas duas décadas aproximadamente um bilhão de pessoas estarão infectadas, duzentos milhões desenvolverão a doença e setenta milhões morrerão devido à tuberculose (OMS, Londres, 1998).

Neste cenário praticamente de pânico em conter uma doença infecciosa cuja transmissão se faz por via aérea, realça a necessidade de maiores pesquisas para se entender a imunopatogênese da Tuberculose, em especial, a interação entre o bacilo e as células do sistema imune. Este entendimento deverá contribuir para o desenvolvimento de novas vacinas e também na descoberta de novas drogas anti-tuberculostáticas (LEE et al., 1995).

1.2. A RESPOSTA IMUNE AO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Estudos clássicos têm demonstrado que a imunidade protetora contra a tuberculose parece ser mediada por células, ao passo que a resposta humoral não mostrou ser importante (LURIE, 1942; RAFFEL, 1949). Segundo HAVLIR et al.,1991

pacientes com tuberculose pulmonar produzem títulos altos de anticorpos reativos aos antígenos filtrados de cultura do *M. tuberculosis*, não havendo evidências de que eles tenham algum papel na proteção.

Estudos em modelos experimentais revelam que a resposta imune mediada por células consiste preferencialmente de células T e macrófagos, os quais atuam cooperativamente no controle da infecção (BOOM et al., 1993). Embora neutrófilos e células *natural killer* (NK) contribuam diretamente por sua atividade micobacteriostática in vitro (MAY AND SPAGNUOLO, 1987; BERMUDEZ and YOUNG, 1991), e os eosinófilos possam exercer fagocitose (CASTRO et al., 1991), o papel destas células na resposta imune in vivo ainda não está definido.

A resposta imune que ocorre na infecção pelo *M. tuberculosis* parece ser mediada por uma interação cooperativa entre linfócitos T e macrófagos, caracterizando um perfil de resposta imune celular. Esta interação é dependente de mediadores solúveis, citocinas produzidas por uma variedade de células mononucleares, mas predominantemente células T (BARNES et al., 1993.). O perfil de citocinas, que mediam esta resistência imunológica no homem ainda não está bem esclarecida.

1.2.1. Participação dos macrófagos

Os macrófagos, ao fagocitar o o *M. tuberculosis*, produzem substâncias extremamente reativas e tóxicas da L- arginina (óxido nítrico) e radicais de oxigênio(HO), os quais tem efeito micobactericida, em seguida produzem mediadores solúveis (citocinas), em resposta ao *M. tuberculosis*, incluindo : IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β (BARNES et al., 1992; TOSSI et al., 1995; VALONE et al.,

1988). Estas citocinas tem um importante papel na imuno-regulação e mediam muitas das manifestações clínicas da tuberculose. Dentre estas citocinas algumas tem um importante papel imunossupressor como o $TGF\beta$ e a IL-10, por exemplo. Uma outra participação dos macrófagos é no processamento e apresentação de antígenos micobacterianos, em associação ao complexo de histocompatibilidade, aos linfócitos T, levando à expansão e ativação destas células

A IL-10 é um potente supressor da síntese de $IFN-\gamma$ pelas células T (FIORENTINO et al., 1989) e pelas células NK (HSU et al., 1992) além de inibir a expressão do MHC interferindo na apresentação antigênica dos macrófagos para as células T (HOWARD & O'GARRA, 1992).

Estudo feito em indivíduos com tuberculose demonstraram que macrófagos expressam um aumento seletivo de mRNA para IL-10 no sítio da doença (BARNES et al., 1993). Recentemente pesquisadores mostraram que células de pacientes com tuberculose ativa produzem mais IL-10 quando estimuladas com o antígeno protéico de 30KD, sugerindo ser esta citocina responsável pela diminuição da resposta linfoproliferativa e da produção de $IFN\gamma$ (TORRES et al., 1998).

O $TGF\beta$ faz parte da família das citocinas imunossupressoras, capaz de regular o crescimento, diferenciação e as funções de macrófagos, linfócitos T e B e células NK. Atua inibindo a produção de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1, e outras citocinas pró-inflamatórias produzidas por estas células. (BRIGHT et al, 1997)

Estudos feitos em monócitos do sangue periférico e nas lesões granulomatosas de indivíduos saudáveis PPD+ e em pacientes com tuberculose pulmonar ativa, mostraram uma produção aumentada de $TGF\beta$ nos indivíduos com tuberculose pulmonar ativa comparada a produção de do que nos indivíduos

saudáveis PPD+ sugerindo sua participação no desenvolvimento desta doença(HIRSCH et al., 1996).

1.2.2. Participação dos Linfócitos T CD4+

Os linfócitos T CD4+ têm uma participação dominante na resposta imune contra a tuberculose. Estes linfócitos, quando estimulados pelos antígenos micobacterianos, produzem um padrão de citocinas que os classificam em duas distintas sub-populações Th1 e Th2. Linfócitos CD4+ Th1 sensibilizados produzem IFN- γ , IL-2; As quais aumentam a atividade microbida de macrófagos,além de induzir hipersensibilidade tardia. Por outro lado, células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, as quais atuam no crescimento e diferenciação das células B, aumentando assim, a resposta imune humoral. O papel dos linfócitos Th2 na tuberculose humana e experimental é ainda controverso. IFN γ e TNF aumentam a atividade microbida em macrófagos murinos, provavelmente pela produção de metabólicos do óxido nítrico (FLESCH & KAUFMAN, 1991; CHAN et al., 1992).

O papel fundamental de linfócitos CD4/Th1 na resistência ao *M. tuberculosis* tem sido demonstrado em indivíduos co-infectados *M. tuberculosis* e HIV. Nestes indivíduos observa-se uma destruição progressiva seletiva de linfócitos CD4+, que resulta em um aumento da susceptibilidade à infecções ao *Mycobacterium tuberculosis*. Adicionalmente, observa-se que pacientes com tuberculose pleural, apresentam uma concentração e expansão de linfócitos CD4+ no sítio da doença . A maior resistência imune nesta forma de tuberculose correlaciona-se também com a produção de citocinas tais como o IFN γ e a interleucina-2 (IL-2) (BARNES et al;

1989). Ambos, a destruição de linfócitos CD4⁺ em indivíduos com HIV e o aumento de CD4 na tuberculose pleural são evidências que linfócitos CD4⁺ Th1 tem um importante papel na resposta imune contra o *M. tuberculosis*.

1.2.3. Participação dos linfócitos T CD8⁺

As células T CD8⁺ constituem uma sub-população de células T com atividade citolítica contra patógenos intracelulares observada em modelos animais de infecção, a exemplo da Listeriose e Shigellose (BARNES et al.,1996). Segundo KAUFMANN (1988) células CD8 murinas pode destruir diretamente células infectadas com *M.tuberculosis* e a depleção das células CD8⁺ resulta no aumento da doença.

Em seres humanos, a participação de linfócitos T CD8⁺ na defesa contra ao *M. tuberculosis* ainda não esta bem definida. No sítio da infecção de pacientes com tuberculose não foi evidenciada a presença de célulasT CD8⁺ (BARNES et al.,1989). Em adição, a observação de que mesmo estando preservada a sub-população de células CD8⁺ em indivíduos HIV⁺, esta sub-população não impede a progressão da tuberculose, colocando em dúvida o papel destas células na resistência contra o *M. tuberculosis* (JONES et al.,1993). Estudos mais detalhados São necessários para verificar a possível participação das células CD8⁺ na resposta imune humana a infecção pelo *M. tuberculosis*.

1.2.4. Participação das células T $\gamma\delta$

Os receptores dos linfócitos T são constituídos de cadeias $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Tem sido mostrado por alguns autores um importante papel dos linfócitos T, a partir de seus receptores com suas respectivas cadeias. Segundo Kaufman além dos linfócitos T $\alpha\beta$, as células T $\gamma\delta$ exercem também um papel importante na resposta imune. Em modelos experimentais de tuberculose verificou-se que as células T $\gamma\delta$ estão bastante aumentadas nos linfonodos e pulmões após uma infecção inicial com o *M. tuberculosis* (JANIS et al., 1989; AUGUSTIN et al., 1989). As evidências de que células T $\gamma\delta$ reconhecem antígenos não protéicos e são capazes de destruir macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* mostram seu provável papel na tuberculose.

Em seres humanos, contudo verificou-se que em cultura de células mononucleares incubadas com o antígeno total do *M. tuberculosis* ocorre uma expansão seletiva das células T $\gamma\delta$ (HAVLIR et al., 1991; BOOM et al., 1992). No entanto outros autores não demonstraram a presença de células T $\gamma\delta$ no sangue periférico de indivíduos PPD+, de pacientes com tuberculose pulmonar, e nem no sítio da doença, como no líquido pleural e linfonodos (TAZI et al., 1992, 1991; BARNES et al., 1992; OHMEN et al., 1991).

Contudo, essas evidências ainda não exclui um possível papel das células T $\gamma\delta$ durante a fase inicial da resposta imune, em pulmões e linfonodos contra o *M. tuberculosis*.

1.3. ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS

O conhecimento dos antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* e de sua imunogenicidade, é certamente a base para o desenvolvimento de medidas de intervenção imunológica como imunoterapia e vacinação. A interação desses antígenos com as células do sistema imune é importante para o estudo da patogênese da tuberculose.

O *Mycobacterium tuberculosis* possui uma estrutura complexa rica em lipídios (glicolipídios, micolatos, lipoarabinomanana), carboidratos e proteínas. Vários destes componentes conferem extrema resistência a ação de enzimas hidrolíticas e protege o bacilo dentro da célula infectada contra a ação de radicais tóxicos produzidas por macrófagos.

A utilização de anticorpos monoclonais para selecionar proteínas recombinantes do *M. tuberculosis* e expressas em *Escherichia coli*, permitiu a identificação de diversos antígenos protéicos (YOUNG et al., 1992), sendo que a maioria das proteínas assim selecionadas são proteínas de choque térmico (HSP), que são altamente conservadas e homólogas na maioria dos seres vivos e expressas abundantemente em situações adversas.

Vários estudos sugerem que essas proteínas representam o alvo principal da resposta imune contra o *M. tuberculosis*. (YOUNG et al., 1988; ENGERS et al., 1986; ANDERSEN et al., 1986, 1988)

As proteínas são classificadas de acordo com sua localização subcelular em: citoplasmáticas (proteínas constitutivas e presentes no citoplasma do bacilo), secretadas no meio e ou associadas à parede celular do bacilo (YOUNG et al., 1992).

As proteínas citoplasmáticas são principalmente as de choque térmico (HSP) que foram identificadas pelo uso de anticorpos monoclonais (YOUNG et. al, 1988). Estas proteínas compreendem em uma família que tem um importante papel na adaptação do bacilo no ambiente intracelular do hospedeiro. Duas proteínas de choque térmico do *M. tuberculosis* tem sido extensivamente estudadas; a de 71 kD e a 65 kD (YOUNG et al.,1988). Os seus respectivos gens foram isolados em diversos laboratórios (HUSSON & YOUNG,1987; SHINNICK et al.,1987; ANDERSEN et al.,1988; YOUNG et al., 1985) e as seqüências de nucleotídeos foram determinadas por LATHIGRA et al.(1988) e SHINNICK et al.(1987).

Essas proteínas interagem com o sistema imune tanto de animais como do homem (MURRAY & YOUNG,1992 ; POLLA, 1988). Com o mapeamento dos epítomos da proteína de 65kD observou-se que alguns epítomos podem ser reconhecidos por linfócitos B e T (MEHRA et al., 1986; LAMB et al., 1987; ANDERSEN et al.,1988; MUNK et al., 1990). Embora tenha sido mostrada uma associação entre doenças auto imunes e proteínas de choque térmico, o estudo deste grupo de proteínas é de grande importância na patogênese e no entendimento da fisiologia e patologia das micobacterias (COHEN &YOUNG,1991).

Já as proteínas que se encontram predominantemente no sobrenadante de cultura do *M. tuberculosis*, ou seja, secretadas no meio de cultura são extremamente potentes em gerar uma resposta imune celular em camundongos infectados com o *M. tuberculosis* (ANDERSEN et.al.,1991; ORME et al .,1992). Neste grupo de proteínas temos:

Superóxido dismutase - (SOD). É uma proteína de aproximadamente 23kD com atividade enzimática, participando principalmente na inibição dos mecanismos de defesa através da inativação de radicais superóxidos tóxicos gerados por macrófagos ativados .

Complexo antigênico 85. Este grupo consiste de três proteínas distintas de peso molecular de aproximadamente 30/31kD, denominado conjuntamente de "complexo 85" (CLOSS et al., 1980; WIKER et al., 1988). São chamadas de 85A (MP44), 85B (MP59) e 85C (MP45), foram purificadas a partir de sobrenadantes de cultura do *M. bovis* BCG (WIKER et al., 1986, DE BRUYN et al., 1987; NAGAI et al., 1991). A imunização de camundongos com os antígenos 85A e 85B induziu uma boa resposta tipo Th1, caracterizada pela produção elevada de IL-2, IFN- γ e TNF- α (LOZES et al., 1997).

ESAT-6 (6KD). Proteína secretada de baixo peso molecular, identificada por apresentar uma alta reatividade na presença de células T de memória de camundongos (ANDERSEN, 1997). Esta proteína tem sido demonstrada estar exclusivamente no *M. tuberculosis* e *M. bovis* (HARBOE et al., 1996).

Proteína de 10kD. Se encontra no grupo da família das proteínas de choque térmico (YOUNG et al., 1991). Células mononucleares do líquido pleural de pacientes e células mononucleares do sangue periférico de indivíduos PPD+, reagem a esta proteína produzindo IFN γ , sendo mais acentuada nas células do líquido pleural, mostrando que a reatividade do Ag é mais acentuada no sítio da doença (BARNES et al., 1992).

Quanto as proteínas associadas a parede celular podemos citar as mais estudadas:

Proteína de 19 KD. Apesar de ter sido encontrada inicialmente em filtrados de cultura (YOUNG et al., 1991) é considerada uma proteína associada a parede celular por se encontrar ancorada por uma estrutura lipídica, sendo também chamada de lipoproteína. Os resultados dos testes imunológicos

demonstram uma alta imunogenicidade à esta proteína, a qual se encontra em quantidades substanciais em cepas virulentas do *M. tuberculosis*.

Proteína de 38KD. É uma lipoproteína e se encontra ancorada na membrana celular do bacilo através de uma estrutura lipídica. Preferencialmente localizada na parede celular, porém em concentrações limites se encontram no meio.(YOUNG et al; 1991) Estudos mostram seu importante papel no metabolismo do fosfato (ANDERSEN et al,1990) e a sua participação na estimulação de linfócitos T tanto em modelos experimentais como em seres humanos (YUONG et al.,1986; HASLOV et al.,1990).

MCEP (mycobacteria cell entry protein). Na tentativa de se encontrar gens de respectivas proteínas associadas a alguns fatores de virulência de bactérias e micobactérias ARRUDA et al.,1993, a partir de uma seleção de uma biblioteca gênica do *M. tuberculosis* (H37Ra) em plasmídeo Bluescript (pBs) utilizando *E. coli* como vetor , selecionou um clone que possuía grande capacidade de aderência e invasão em células não fagocíticas (HELAS) e com capacidade de invasão e sobrevivência em macófagos humanos. A proteína expressa a partir do gene de 1535 kB, de aproximadamente 52kD foi denominada de proteína associada a penetração de micobactéria nas células (MCEP). Esta proteína esta presente na membrana do *M. tuberculosis* e *M. bovis*, sendo expressa predominantemente durante a fase logarítima do crescimento *in vitro* (HO & RILEY, 1997). A purificação e caracterização já foram relatadas. (CHITALE et al., 1995).

Recentemente foi descrito e evidenciado no genoma do *M. tuberculosis*,o fragmento de DNA do *M. tuberculosis* (H37RA) com 1535 pares de bases que codifica a proteína MCEP (COLE et al.,1998).

A maioria dos organismos intracelulares, a exemplo o *M. tuberculosis* possui na sua estrutura componentes que lhe permitem escapar do sistema de defesa do organismo, proporcionando a sua sobrevivência e perpetuação. Estes componentes ou produtos do metabolismo dos organismos intracelulares, responsáveis pela evasão do sistema de defesa do hospedeiro, são denominados conjuntamente de fatores de virulência (HO & RILEY, 1997).

Alguns componentes do *M. tuberculosis* tem sido descritos a exemplo de: LAM, ácido micólico, glicolipídicos, sulfatides são considerados também como fatores de virulência, ou seja, participam durante a infecção e doença (RILEY, 1995). CHAN e colaboradores, 1992 mostrou que liporabinomannana (LAM) extraído de cepas virulentas do *M. tuberculosis* (H37RV) era responsável pela resistência a metabólitos oxidativos. Ácido micólico e glicolipídicos parecem participar na formação de granulomas (RILEY, 1995). Também tem sido descrito em outros microrganismos como na *Listeria monocytogenes* e na *Shigella flexneri*, proteínas responsáveis pela entrada do microrganismo e sobrevivência do mesmo. O movimento intracelular na *Listeria* é mediado pela proteína Acta e na *Shigella* pela proteína IcsA (DOMANN et al., 1990; BERNARDINI et al., 1989). Isto também foi evidenciado na *Yersinia pseudo tuberculosis* (BLISKA et al., 1995; ISBERG et al., 1990).

O estudo portanto da interação do *M. tuberculosis* e de seus componentes com as células do sistema imune, podem contribuir para uma maior compreensão da patogênese da tuberculose bem como, da possibilidade da descoberta de novas vacinas e componentes diagnósticos mais eficazes.

A MCEP é uma proteína de membrana e sua função na interação com as células do sistema imune, não foi ainda investigadas sendo portanto objeto de nosso estudo.

2 OBJETIVOS:

Sendo o MCEP uma importante proteína que permite além da invasão do *M. tuberculosis* a sua sobrevivência no meio intracelular macrófago, é importante conhecer se esta proteína é reconhecida por anticorpos e ou células de indivíduos infectados ou doentes com tuberculose pulmonar.

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a resposta imune humoral e celular contra a proteína MCEP do *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos PPD-,PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar .

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a presença de anticorpos anti-MCEP no soro de indivíduos com tuberculose pulmonar;

2. Quantificar a resposta linfoproliferativa à proteína MCEP de indivíduos PPD -, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar e comparar com o antígeno total do *M.tuberculosis* e mitógenos;

3. Avaliar a produção de citocinas produzidas por linfócitos T e macrófagos após estímulo *in vitro* com a proteína MCEP.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. GRUPO DE ESTUDO

3.1.1. Pacientes com Tuberculose Pulmonar

Participaram do presente estudo dez pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar com base em dados clínicos, radiológicos e bacteriológicos. Os pacientes foram recrutados do Hospital Octávio Mangabeira e do Instituto Bahiano para Investigação do Tórax (I.B.I.T)-Fundação José Silveira em Salvador, Bahia.

Os Critérios de inclusão utilizados foram:

- * diagnóstico recente (menos de um mês de tratamento);
- * exame de escarro (baciloscopia) positivo;
- * reatividade ao teste de PPD .

Os Critérios de exclusão utilizados foram :

- * positividade na sorologia para HIV;
- * presença de doença crônica (neoplasias, diabetes mellitus, doenças auto-imunes, etc.);
- * presença de história prévia de tuberculose;
- * presença de desnutrição grave.

3.1.2. Grupo Controle

O grupo controle foi composto de vinte indivíduos sadios, sendo dez com teste cutâneo ao PPD positivo (PPD+) e dez com teste cutâneo ao PPD negativo (PPD-).

As características dos grupos estudados encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição pela idade (média) e sexo dos grupos controles e pacientes com Tuberculose pulmonar.

GRUPOS	IDADE (MÉDIA)	SEXO	
		MASCULINO	FEMININO
TBP	35	9	1
PPD+	32	5	4
PPD-	29	6	4

3.2. ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS E MITÓGENOS

Os antígenos utilizados foram: 1) Antígeno recombinante 52kD do *M. tuberculosis* (MCEP); 2) antígeno total do *M. tuberculosis* (H37Rv). O antígeno recombinante de 52kD (MCEP) foi gentilmente doado pelo Dr. Lee Riley Berckerley-University of California e o antígeno total do *M. tuberculosis* (H37Rv) produzido localmente (CPqGM- Fiocruz - BA) através de sonicação. As bactérias cresceram por 15 dias em meio líquido Middlebrook ADC Enrichement Difco Lab. USA(Gibco-BRL). Em seguida foram previamente lavadas em PBS estéril através de centrifugação. O sedimento foi dissolvido em solução de salina tamponada (STF) estéril e depois sonicado, com o sonicador (Branson Sonic Power-Connectant). A quantidade de proteína presente foi mensurada pelo método de Lowry .

O mitógeno Pokeweed-PWM (Gibco - BRL) foi usado na diluição final de 1:100 em meio RPMI 1640.

3.3. DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI- MCEP

Para a determinação dos títulos de anticorpos anti-MCEP foram utilizados soros de indivíduos controles e dos pacientes e a dosagem foi feita através da técnica de ELISA.

Utilizou-se placas de poliestireno Immulon 4, fundo chato, 96 poços (Dynatech: Chantilly, Virginia, EUA). Estas placas foram previamente sensibilizadas com 1µg/ml do antígeno solúvel de MCEP diluído em tampão carbonato 0,06M pH 9,6 por 2 horas a 37°C seguido de uma incubação a 4°C durante a noite. As placas foram lavadas com salina tamponada (STF) contendo 0,05% de Tween-20(Sigma) e os sítios livres foram bloqueados com salina tamponada (STF) contendo 1% de soro albumina bovina(BSA) (Sigma) a 37°C por 2 horas. Os soros diluídos em salina tamponada (STF) foram colocados nos poços em diluição única de 1:40 e incubados a 37°C por 2 horas e em seguida a 4°C durante a noite.

A anti-IgG humana conjugada à fosfatase alcalina(Sigma) foi acrescentada na diluição de 1:1000 em salina tamponada (STF) por 1 hora a 37°C . Cada uma destas incubações foi seguida por três lavagens com salina tamponada (STF) . As placas foram reveladas com p-nitro-fenil-fosfato (substrato da fosfatase alcalina) e as reações interrompidas com 50 µl/ poço de NaOH (3N).

3.4. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Vinte mililitros(ml) de sangue venoso foi obtido de paciente e indivíduos controle por venopunção, usando heparina como anticoagulante. O sangue obtido foi diluído com igual volume de salina a 0,85% e colocado gentilmente sobre um gradiente padronizado de separação, Ficoll- Hypaque (Lymphocyte Separation Medium; Bionetics Laboratory, Kensington, EUA). A seguir, a mistura foi centrifugada a 1.200 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente e o anel de células mononucleares obtido foi aspirado, lavado 3 vezes com salina (0,85%) a 1000 rpm e ressuspenso em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO Laboratories; Grand Island, EUA), suplementado com HEPES (10mM), L-Glutamina (2mM), Penicilina (200UI/ml) e Estreptomicina (100 ug/ml) (Gibco, Grand Island NY, EUA). O número de células obtidas foi verificado através da contagem em câmara de Neubauer e a concentração ajustada segundo a necessidade de cada experimento.

3.5. TESTE DE TRANSFORMAÇÃO LINFOBLÁSTICA

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células por mililitro em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone Lab Logan Utah, EUA). Alíquotas de 0,2 ml (2×10^5 células) da suspensão celular foram cultivadas em triplicata, utilizando placas de microtitulação de fundo chato (Costar, New York, EUA) e estimuladas com Pokeweed (GIBCO) utilizado na concentração de 1:100 e pelos seguintes antígenos: Antígeno total do *M. tuberculosis* (H37RV), o antígeno recombinante de 52 KD do *M.*

tuberculosis (MCEP) na concentração de 1 e 10 µg/ml. Após a estimulação, as células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% CO₂ mantidas por 5 dias.

No último dia de cultura, foi adicionado, às placas, 1µCi de timidina triada [³H timidina] (Amersham, Inglaterra). Após aproximadamente 6 horas de incubação, a captação de timidina foi medida em contador de cintilação beta (Wallac 1409, Finlândia). Os resultados obtidos foram expressos em contagens por minuto (cpm), seguidas do erro padrão da média das triplicatas. Os valores são apresentados como Índices de Estimulação (I.E), os quais representam a razão entre a média da cpm da cultura estimulada pela média da cpm da cultura não estimulada (background).

3.6. PRODUÇÃO DE CITOCINAS

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram cultivadas na concentração de 3x10⁶ células por mililitro em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino, em placas de 24 poços em incubadora contendo atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C, e estimuladas com antígenos micobacterianos (1ug/ml) para induzir a produção de citocinas. Os sobrenadantes foram colhidos após 48 horas de incubação e estocados a - 20°C até o momento da dosagem.

3.7. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

A determinação da produção de citocinas foi realizada através do ensaio imunoenzimático - ELISA utilizando Kits comerciais (Genzyme, EUA). Foram

utilizados para a dosagem os sobrenadantes das CMSP dos indivíduos controles e dos pacientes, colhidos após 48 horas de incubação.

O ensaio corresponde a um ELISA sanduíche: o primeiro anticorpo monoclonal de captura reveste o fundo da placa, e o segundo anticorpo monoclonal biotinilado detecta e revela a citocina. Posteriormente, adiciona-se a estreptavidina conjugada a peroxidase que reage com o substrato cromogênico, produzindo coloração sendo então quantificada, comparando-se com uma curva padrão.

As citocinas dosadas foram : IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β .

3.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE MCEP (1 μ g/ml) SOBRE AS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMNSP)

As células mononucleares foram cultivadas numa concentração de 1×10^6 células por mililitro em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone Lab Logan Utah, EUA). Alíquotas de 0,2 ml (2×10^5 células) da suspensão celular foram cultivadas em triplicata, utilizando placas de microtitulação de fundo chato (Costar, New York, EUA) e estimuladas com Concanavalina A (ConA) (10 μ g/ml), MCEP utilizados na concentração de 1 μ g/ml e Anti-TGF- β (10ng/ml). As células foram incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ mantidas por 3 dias. No último dia de cultura, foi adicionado, às placas, 1 μ Ci de timidina triciada [³H timidina] (Amersham, Inglaterra). Após aproximadamente 6 horas de incubação, a captação de timidina foi medida em contador de cintilação beta (Wallac 1409, Finlândia). Os resultados obtidos foram expressos em contagens por minuto (cpm), seguidas do erro padrão da média das triplicatas. Os valores são apresentados como Índices de Estimulação (I.E), os quais representam a razão

entre a média da cpm da cultura estimulada pela média da cpm da cultura não estimulada (background).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da proliferação e da produção de citocinas das células mononucleares do sangue periférico, em resposta a cada estímulo dos grupos avaliados foram comparadas através da ANOVA unidirecional de Kruskal Wallis com o pós teste de Dunn. A diferença entre os estímulos foi considerada significativa quando a probabilidade (p) de erro tipo I foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Já a avaliação do efeito inibitório de MCEP bem como, a produção de IgG total foram analisadas usando o teste T Student. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism version 2.0 e StatMate version 1.0 – GraphPad Software INC, 1995.

4 RESULTADOS:

4.1. AVALIAÇÃO DE IGG TOTAL

Na figura 1 observa-se que a MCEP é reconhecido por anticorpos séricos presentes no soro de indivíduos PPD-, PPD+ e em pacientes com tuberculose pulmonar. No entanto, os níveis de IgG total contra MCEP são menores que os observados contra o antígeno total do *M. tuberculosis* ($p < 0,05$) em todos os grupos estudados.

4.2. RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

A proliferação linfocitária induzidas por MCEP, nos três grupos estudados foi pequena, muito embora em pacientes e controles PPD+ a proliferação ao antígeno total do *M.tuberculosis* foi maior, sendo a diferença entre a proliferação induzida por MCEP e o antígeno total significativa. Em todos os grupos estudados a resposta a PWN foi bastante elevada (Figura 2).

4.3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Foram avaliadas várias citocinas que estão envolvidas na resposta imune da tuberculose pulmonar (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-10 e TGF β) nos sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico dos grupos estudados em resposta ao estímulo *in vitro* com MCEP e o antígeno total do *M. tuberculosis*.

A produção de IL-2 em resposta à MCEP *in vitro* foi de 20 pg/ml, 6 pg/ml e 17 pg/ml nos sobrenadantes dos grupos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar, respectivamente. Em todos os grupos estudados IL-2 apresenta uma produção semelhante ao não estimulado não mostrando portanto significância estatística ($p > 0.05$).

Em resposta ao antígeno total do *M. tuberculosis* a produção de IL-2 foi de 49pg/ml, 27 pg/ml e 70pg/ml para os mesmos grupos estudados. Estes resultados estão representados graficamente na figura 3.

Na figura 4 podemos observar que a produção de IFN γ em resposta a MCEP em todos os grupos estudados. Os níveis de IFN γ produzidos em resposta a MCEP foram de 11pg/ml, 1 pg/ml e 5pg/ml semelhante ao não estimulado em todos os grupos estudados. Já em resposta ao antígeno total do *M. tuberculosis* a produção de IFN γ foi de 471pg/ml, 864pg/ml e 504pg/ml respectivamente nos grupos controles PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar. Semelhante a IL-2, os níveis de IFN γ em resposta a MCEP, foram inferiores quando comparados aos níveis de IFN γ em resposta ao antígeno total do *M. tuberculosis* em todos os grupos estudados ($p < 0,01$).

Os níveis de TNF α encontrados nos sobrenadantes das células em resposta a MCEP foram de 1pg/ml, 4pg/ml e 58 pg/ml nos 3 grupos estudados. As respostas dos grupos controles são semelhantes as culturas não estimuladas, apresentando uma discreta produção no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar, apesar de não ser estatisticamente significativa. Em resposta ao antígeno total do *M. tuberculosis* os níveis de TNF α encontrados foram de 389pg/ml, 174pg/ml e 754pg/ml respectivamente nos grupos controles PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (figura 5).

A produção de IL-10 induzida por MCEP, nos diversos grupos está representada na fig. 5. A produção de IL-10 só foi estatisticamente diferente das culturas não estimuladas no grupo dos indivíduos PPD-. Após estímulo com o antígeno total do

M.tuberculosis a produção observada foi de 65pg/ml ,81pg/ml e 209pg/ml nos grupos PPD-,PPD+ e pacientes, respectivamente. Somente no grupo de pacientes, a diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação as culturas não estimuladas. ($p>0.05$) (figura6).

Na figura 7 estão os resultados da avaliação de TGF β nos sobrenadantes de cultura de mononucleares dos grupos estudados. A produção de TGF β em resposta ao estímulo com MCEP foi de 1742 pg/ml, 1773 pg/ml e 2361pg/ml e nas culturas não estimuladas foi de 725 pg/ml,1078 pg/ml e 602pg/ml nos grupos controles PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar .Estes resultados demonstram que MCEP foi capaz de induzir TGF β em quantidades superiores a produção basal das células não estimuladas. Houve diferença estatisticamente significativa($p<0.05$). Já em resposta ao antígeno total de *M. tuberculosis* a produção foi de 1936pg/ml, 1807pg/ml e 1910 pg/ml respectivamente nos grupos estudados. Tanto MCEP como o antígeno total do *M. tuberculosis* induziram a produção de TGF β nos três grupos estudados, sendo que os níveis de TGF β induzidos por MCEP foram semelhantes aos níveis induzidos pelo antígeno total, não havendo diferença estatística significativa entre eles ($p>0.05$).

4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE MCEP (1ug/ml) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMNSP) INDUZIDAS POR ConA.

Investigamos, então a capacidade inibitória da MCEP sobre a proliferação linfocitária induzida por mitógeno. Para tanto, adicionamos MCEP (1 μ g/ml) à cultura de células mononucleares estimuladas por ConA (10 μ g/ml). Esses dados estão representados

na figura 8. A adição de MCEP resultou na diminuição da atividade linfoproliferativa induzida por concanavalina A. Se neste mesmo cultivo for adicionado anti-TGF- β há uma reversão da resposta linfoproliferativa induzida por ConA, levando a sugerir um possível poder inibitório de MCEP mediado pela secreção de TGF- β .

4.5. GRÁFICOS

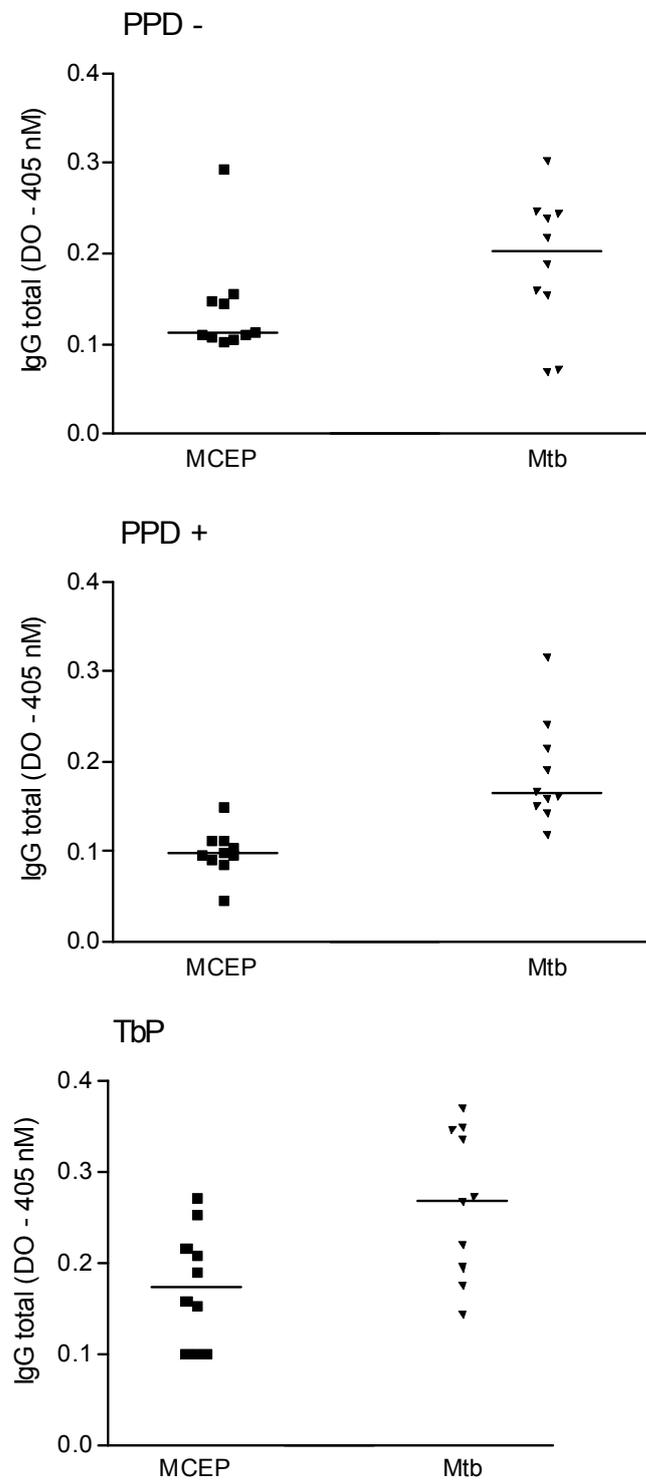


Figura 1. Níveis de IgG total anti-MCEP e antígeno total do *M. tuberculosis* (Mtb) presente no soro de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar.

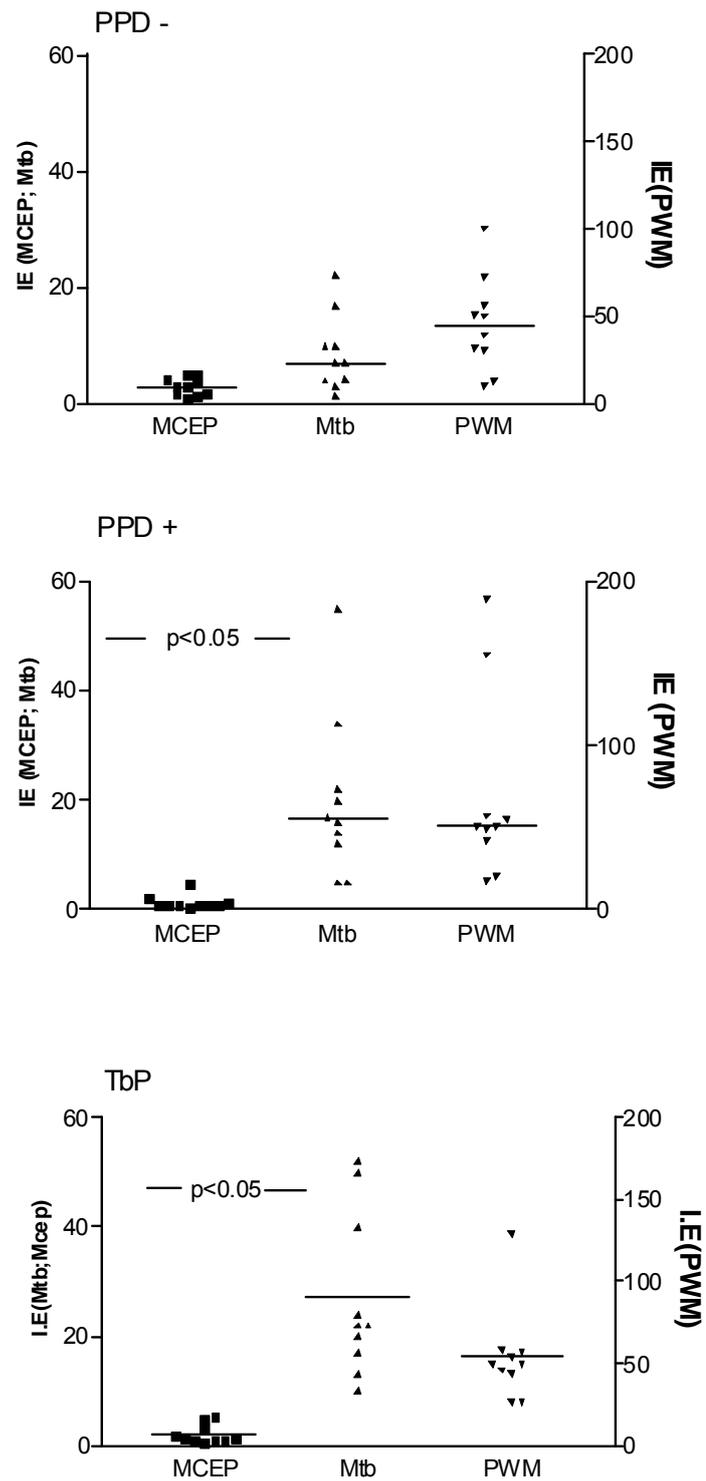


Figura 2. Resposta linfoproliferativa de células de indivíduos PPD-, PPD+ e paciente com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP, antígeno total de *M. tuberculosis* (Mtb) e pokeweed (PWM). IE = Índice de Estimulação. As barras horizontais correspondem a mediana de cada grupo.

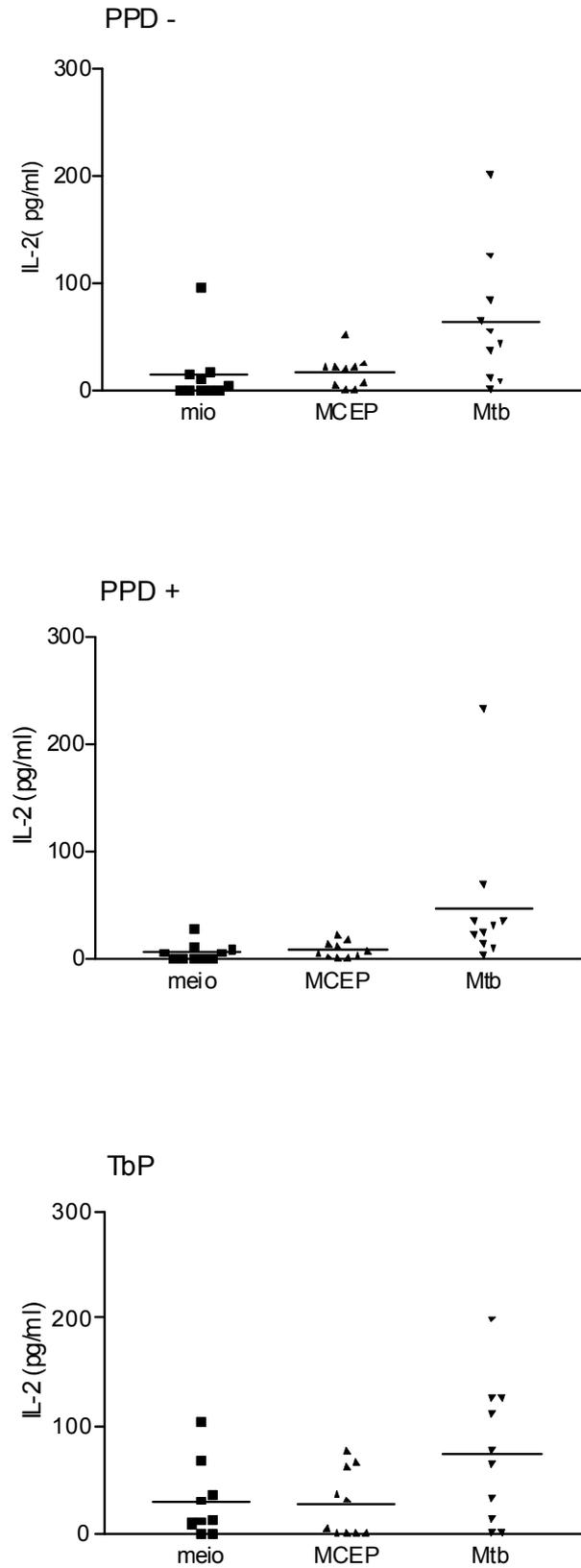


Figura 3. Produção de IL-2 por células mononucleares de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb). As barras horizontais correspondem a mediana de cada grupo.

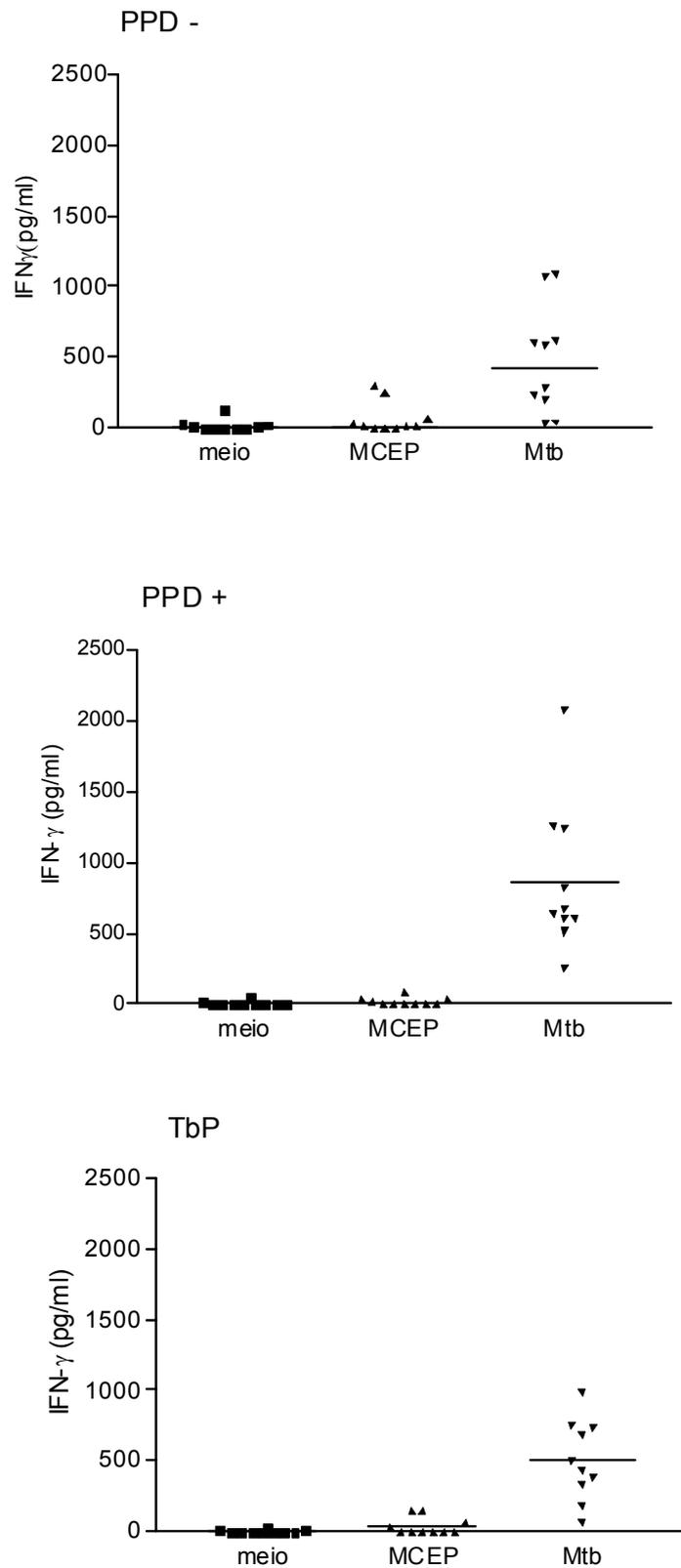


Figura 4. Produção de IFN γ por células mononucleares de indivíduos PPD-,PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb). As barras horizontais correspondem a mediana de cada grupo.

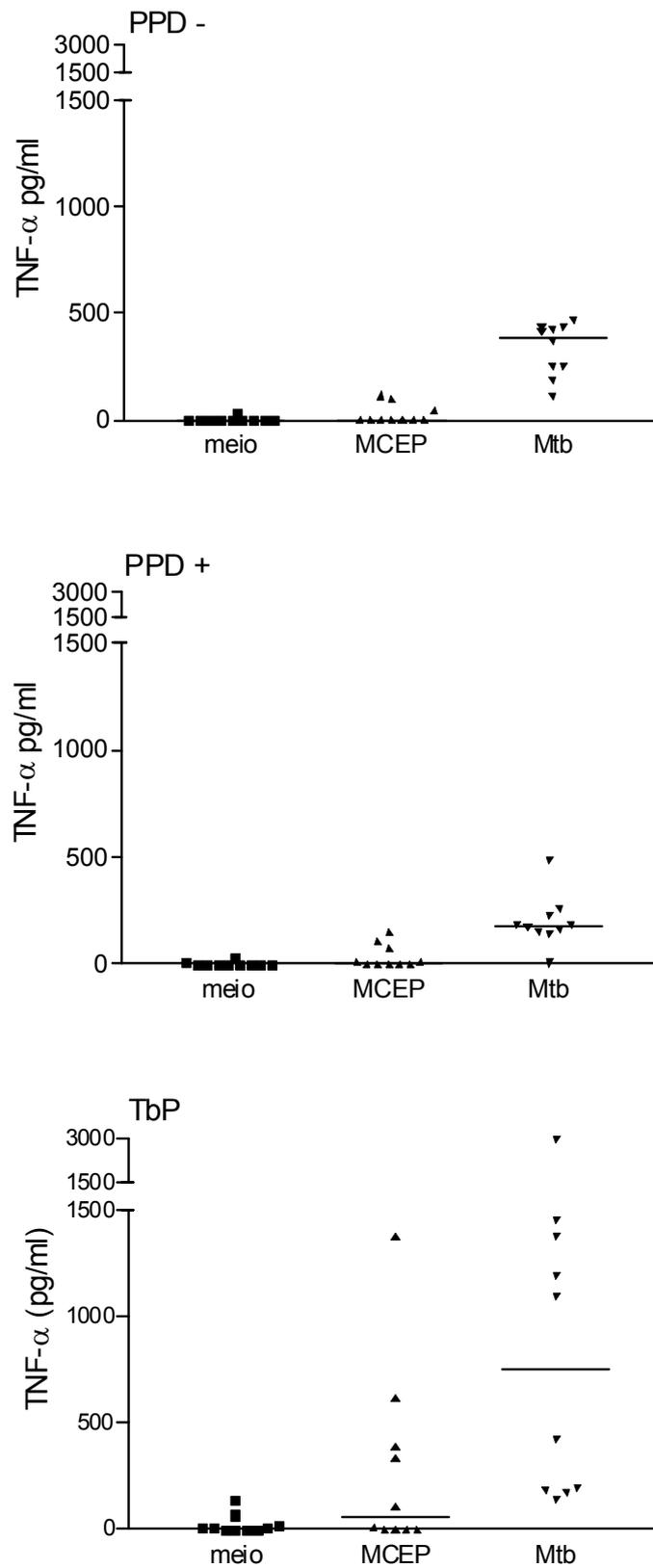


Figura 5. Produção de TNF α por células mononucleares de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb). As barras horizontais correspondem a mediana de cada grupo.

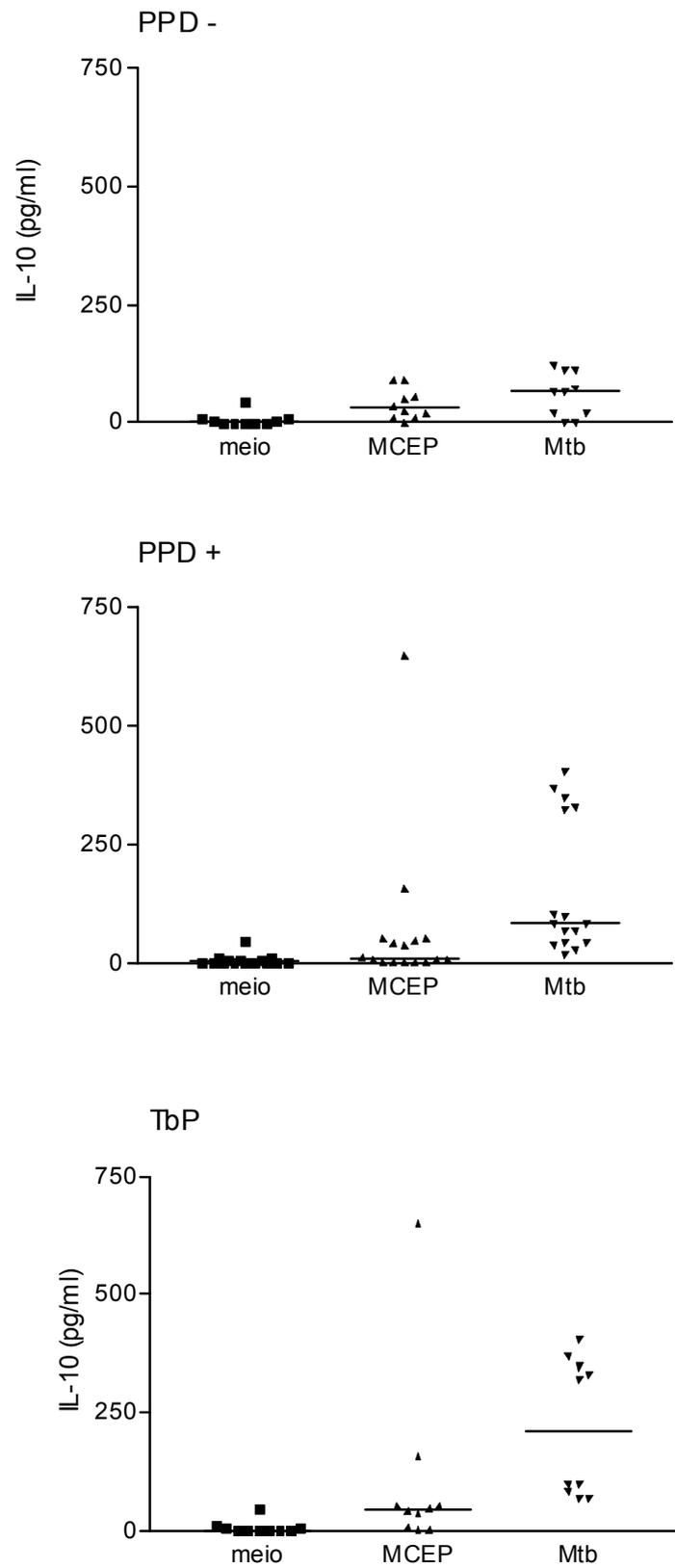


Figura 6. Produção de IL-10 por células mononucleares de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb). As barras horizontais correspondem a mediana de cada grupo.

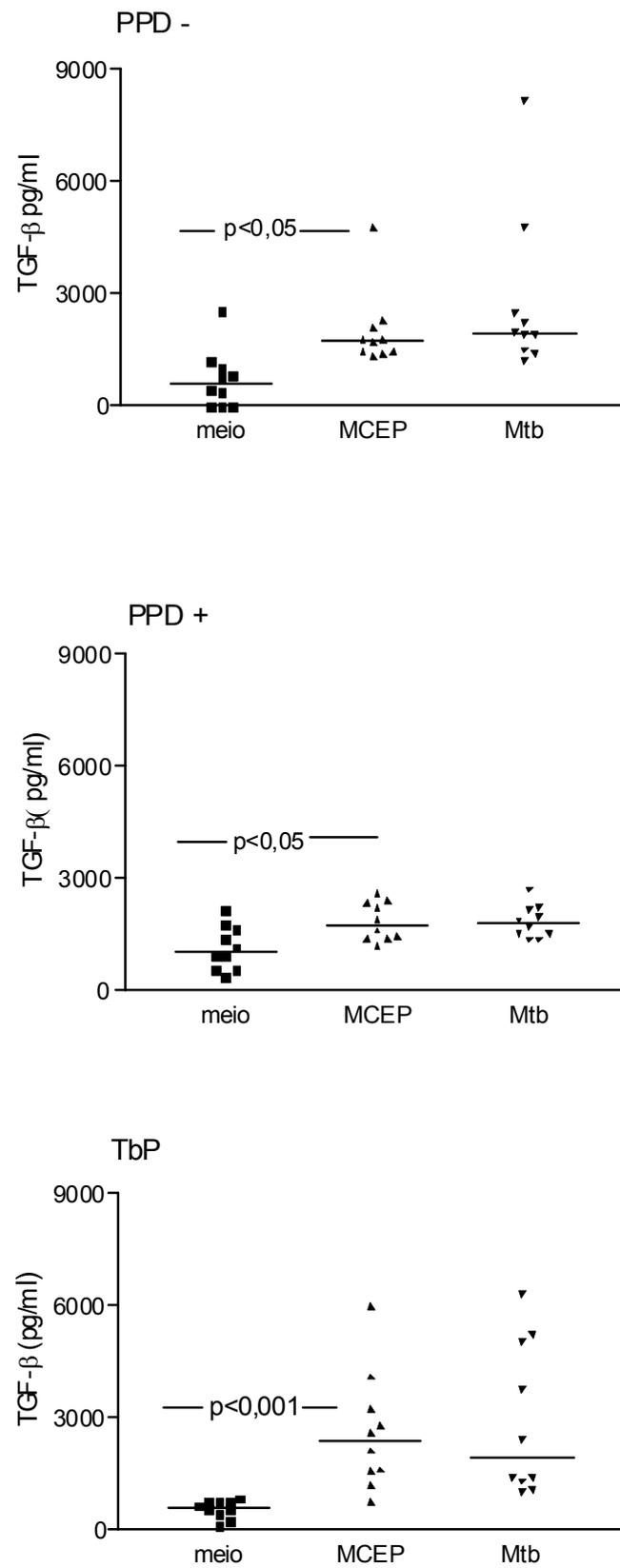


Figura 7. Produção de TGF β por células mononucleares de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar (TbP) após cultivo *in vitro* com MCEP e antígeno total do *M. Tuberculosis* (Mtb). As barras horizontais correspondem a mediana de cada grupo.

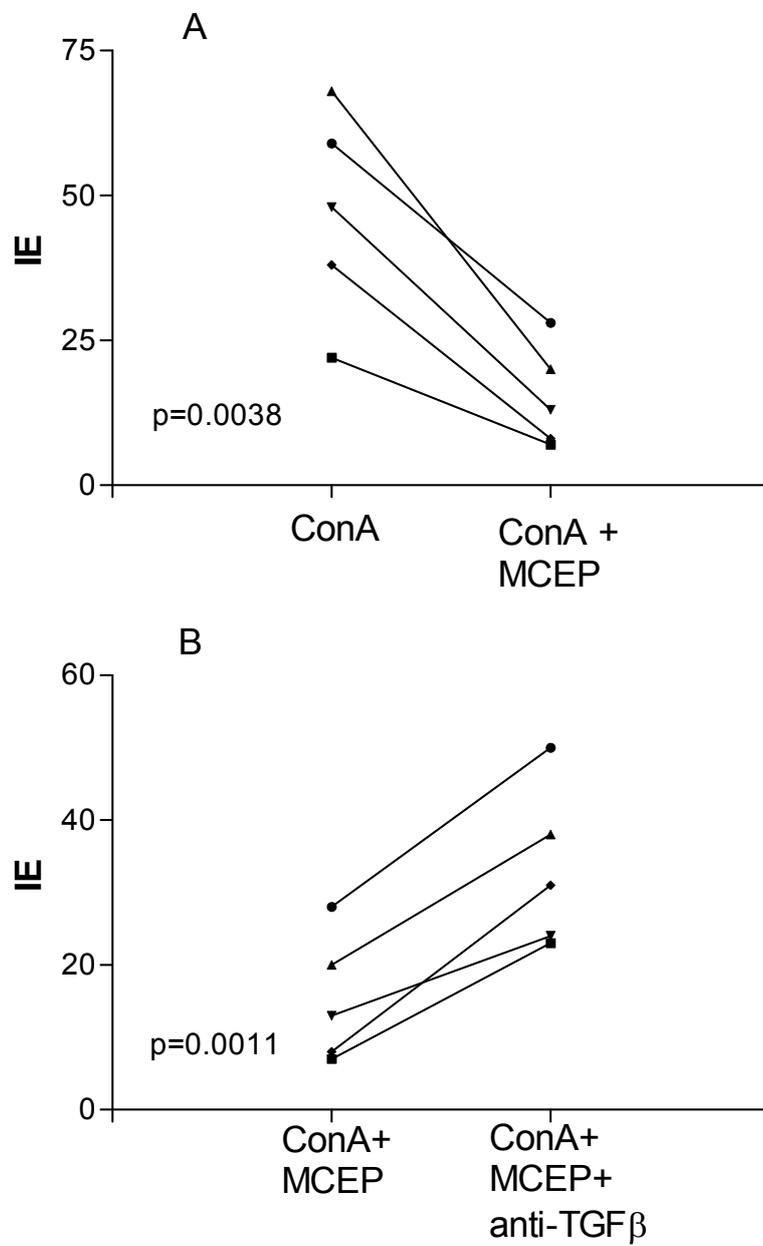


Figura 8. Avaliação do efeito inibitório de MCEP sobre as células mononucleares, após estimulação com ConA.

5 DISCUSSÃO:

A proteína, *Mycobacteria Cell Entry Protein* (MCEP) esta relacionada com a entrada e sobrevivência do *M. tuberculosis* em células hospedeiras. Apesar da importância desta molécula para o *M. tuberculosis*, nada se conhece sobre sua relação com o sistema imune do hospedeiro. No presente estudo, avaliamos vários parâmetros da resposta imune à proteína MCEP (*Mycobacteria Cell Entry Protein*) utilizando células de indivíduos normais, infectados e doentes com tuberculose.

Utilizamos diferentes estratégias para avaliar a resposta imune à proteína MCEP. Avaliamos a produção de anticorpos anti-MCEP, a capacidade de proliferação linfocitária e a produção de citocinas, através das células mononucleares de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar.

As repostas contra MCEP foram comparadas com aquelas induzidas pelo antígeno total do *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv).

Os resultados obtidos na produção de anticorpos revelam que MCEP é reconhecida pelas células B, produtoras de anticorpos. Os níveis de IgG contra MCEP são menores que os níveis de IgG contra o antígeno total do *Mycobacterium tuberculosis* ($p < 0,05$). Vários estudos revelam que pacientes com tuberculose pulmonar desenvolvem títulos altos de anticorpos reativos ao *M.tuberculosis*, não havendo evidências que eles tenham algum papel na proteção (DIANE et al, 1990).

Embora os anticorpos não tenham papel protetor na tuberculose, utilizamos estes dados como evidência de que MCEP é reconhecida por linfócitos T e B, já que é capaz de induzir a produção de anticorpos IgG em pacientes.

Pacientes com tuberculose são capazes de reconhecer vários antígenos (10kD,30kD, 38kD e 65kD) tanto pela proliferação de células mononucleares de como pela produção de citocinas (BARNES et al.,1996; ARRUDA et al.,1998). No nosso estudo, os resultados obtidos da proliferação celular através da adição de MCEP nas culturas de células mononucleares indicam que a esta proteína não foi capaz de induzir a proliferação celular. A ausência de proliferação linfocitária pode decorrer da ausência de reconhecimento de MCEP pelas células T ou pela indução de citocinas deativadoras de células T, possivelmente produzidas por macrófagos estimulados por MCEP.

Os relatos de DEL PRETE e colaboradores(1993), sobre a participação de citocinas regulatórias e inflamatórias na tuberculose sugerem que estes produtos podem exercer diferentes papéis na resposta imune em pacientes com tuberculose pulmonar.

A IL-2 é uma citocina importante no crescimento celular, participa inicialmente na ativação e diferenciação de células T CD4. Estudos in vitro demonstram que células mononucleares de pacientes com tuberculose pulmonar produzem baixos níveis de IL-2 quando estimulados com PPD (TOSSI et al.,1986). Estudos realizados por JOHSON et al.(1998) revelam que a administração de baixas doses de IL-2 recombinante humana, em combinação com terapias multi-drogas, aos pacientes com tuberculose resistente a múltiplas drogas (MDR TB), foi capaz de alterar os parâmetros da resposta imune in vitro associadas ao perfil clínico e bacteriológico dos pacientes. Nossos resultados demonstram que não houve produção de IL-2 pelas células mononucleares dos grupos estudados em resposta à MCEP. Como a interleucina-2 participa na ativação e diferenciação de células TCD4, a ausência de indução de IL-2 se correlaciona com a ausência de resposta linfoproliferativa .

A importância do $\text{IFN}\gamma$ na proteção contra micobactriosas tem sido demonstrada em animais deficientes do gene do $\text{IFN}\gamma$ (COOPER et al.,1993; FLYNN et al.,1993).O $\text{IFN}\gamma$ é uma citocina imuno-regulatória que tem uma potente ação na ativação de macrófagos, participando na apresentação de antígenos por estas células (BERMUDEZ & KAPLAN,1995).

ZHANG e colaboradores,(1995) demonstraram que indivíduos saudáveis com resposta contra tuberculina (PPD+) produzem níveis altos de $\text{IFN}\gamma$ e que em pacientes com tuberculose pulmonar a produção de IL-2 e $\text{IFN}\gamma$ estava diminuída. Nossos resultados demonstram que MCEP não induziu a produção de $\text{IFN}\gamma$. Nossos dados em conjunto revelam que MCEP não parece estar envolvida na indução de uma resposta imune protetora, compatível com o padrão Th1.

Os parâmetros responsáveis pela imunidade protetora em pacientes com tuberculose não estar tão claro, contudo saber os mecanismos que resultam nesta possível falha da resposta imune permitirá identificar caminhos para o tratamento e prevenção da tuberculose. A capacidade de MCEP em evitar uma resposta imune protetora pode residir na interação dos macrófagos com o bacilo da tuberculose, onde estes desenvolvem mecanismos apropriados para sua sobrevivência no interior destas células. Os mecanismos de escape das micobactérias nos macrófagos incluem, inicialmente, a inibição da formação do fagolisossoma, permitindo a sobrevivência do patógeno no compartimento endossomal, cujo pH não é tão ácido (CLEMENS & HORTWITZ,1995). Aparentemente esses mecanismos estão associados a presença de determinados componentes glicolipídicos da superfície micobacteriana como, por exemplo, o dimicolato de trealose (DMT) (SILVA - comunicação pessoal).

Além da inibição da fusão do fagolisossoma, um outro mecanismo de escape seria a desativação de macrófagos e linfócitos por componentes da parede do bacilo, como lipídios, glicolipídios e proteínas, através da produção de compostos intermediários e reativos do oxigênio (ROI) (CHAN et al., 1991), e da produção de citocinas inflamatórias (SILVA et al., 1993), além de induzir citocinas como o TGF β e IL-10 (BERMUDEZ,1993).

O TNF α é uma citocina pró-inflamatória, altamente pirogênica e participa na formação de granuloma na infecção pela micobactéria (SMITH et al.,1997'). Seu papel no granuloma deve-se ao macrófago, que contribui para a contenção da infecção pela micobactéria (BARNES et al.,1993).

O papel protetor do TNF α na tuberculose murina pode ser evidenciado nos ensaios de bloqueio desta citocina com anticorpos neutralizantes durante a infecção *in vivo*, quando ocorre aumento da carga bacilífera, como foi demonstrado por KLINDER et al., 1989 e a na formação do granuloma em resposta a infecção por BCG, demonstrado por MARINO *et al.*,1997. No entanto o papel benéfico do TNF α não tem sido evidente em pacientes com tuberculose pulmonar.

Nosso estudo revela que MCEP não foi capaz de induzir a produção de TNF α . Utilizando um sistema *in vitro*, FLESH et al., (1990) demonstraram que o efeito micobactericida do TNF α é dependente do IFN γ . Confirma-se neste caso, a incapacidade de MCEP em induzir uma resposta protetora (ausência de IFN γ e TNF α). Foi,então, necessário avaliar se MCEP estava promovendo a desativação de macrófagos, além da incapacidade de indução da produção de citocinas ativadoras que contribuem na erradicação da micobactéria.

A IL-10 é conhecida como uma citocina que é capaz de regular negativamente a expansão de células TH1 no modelo murino. Ela participa inibindo

a atividade de macrófagos *in vitro* o que provavelmente contribui para a sobrevivência da micobactéria no interior da células (MURRAY *et al.*,1997).

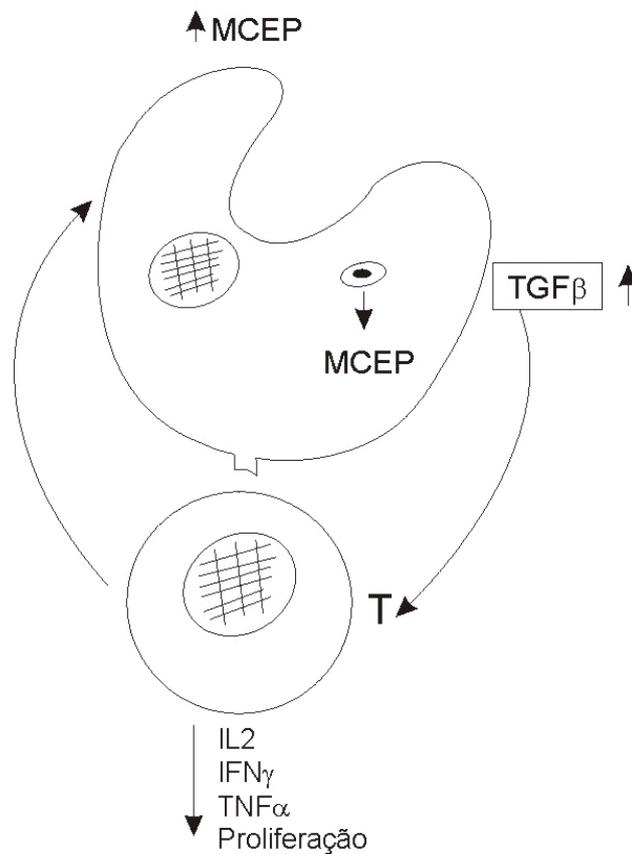
Estudos demonstram que macrófagos são capazes de produzir IL-10 quando estimulados por alguns antígenos micobacterianos, tal como lipoarabinomannan (BARNES *et al.*,1992) e que a IL-10 pode inibir a síntese de citocinas tais como $TNF\alpha$ por macrófagos (De WAAL MALEFYT *et al.*,1991) e $IFN\gamma$ pelas células T (MOSMANN *et al.*, 1991). Os nossos dados indicam que MCEP não induziu a produção significativa de IL-10.

$TGF\beta$ compõe a família das citocinas imunossupressoras, capaz de regular o crescimento, diferenciação e funções de macrófagos, células B, células T e células NK. O $TGF\beta$ atua desativando macrófagos (TSUNAWKI *et al.*1988), na produção de oxigênio e de compostos do óxido nítrico (DING *et al.*,1990). Age também sobre a produção de $IFN\gamma$ levando à inibição da expressão de HLA-DR em monócitos (CZARNIECKI *et al.*,1988) e na produção de $TNF\alpha$ e IL-1 e outras citocinas próinflamatórias produzidas por macrófagos, células B, T e NK (KERLY,1986;STEVENS,1994).

IL-10 e $TGF\beta$ funcionam com citocinas moduladoras deprimindo a blastogênese e a produção de $IFN\gamma$ pelas células T(HIRSCH *et al.*,1996). Estudos tem demonstrado que alguns componentes do *M. tuberculosis* tais como: a proteína de 30Kda (HIRSCH *et al.*,1996) e Lipoarabinomanana (DAHL *et al.*,1996) são capazes de induzir a produção de $TGF\beta$ em monócitos. TOSSI *et al.*,(1995) em seu estudo, demonstraram a expressão de $TGF\beta$ nas células de Langherans e células epitelióides no granuloma e em monócitos de pacientes com tuberculose. Em nosso estudo MCEP induziu a produção de $TGF\beta$ em todos os grupos estudados, em níveis semelhantes aos induzidos pelo antígeno total do *M. tuberculosis*. Estudo feito por BRIGHT *et al.*,(1997)

revelou a participação de $TGF\beta$ inibindo a ativação e diferenciação celular através de IL-2 e na expressão do receptor de IL-2, contribuindo para a morte celular programada, apoptose em células T. Estes achados contribuem para interpretação dos nossos resultados. MCEP induz a produção de $TGF\beta$ e através desta citocina inibe a atividade linfoproliferativa estimulada por ConA, já que a inibição do $TGF\beta$ leva a restauração da proliferação. Nossos dados em conjunto fundamentam a atividade funcional de MCEP em permitir a sobrevivência do *M. tuberculosis* dentro das células hospedeiras escapando, portanto do sistema imunológico de defesa, segundo o modelo proposto abaixo.

5.1. ESQUEMA DE INTERPRETAÇÃO



6 CONCLUSÕES:

- As Imunoglobulinas de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com tuberculose pulmonar reagem contra MCEP, o que sugere um reconhecimento desta proteína.
- A incapacidade da MCEP em induzir proliferação e produção de IL-2, IFN γ e TNF α das células mononucleares humanas mesmo de indivíduos que reagem ao antígeno *do M. tuberculosis*, pode estar associada a um possível papel desta proteína no mecanismo de escape do bacilo.
- A MCEP induz a produção de TGF β por células mononucleares, o que reforça o seu envolvimento nos mecanismos de escape do bacilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDERDSEN,P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand. J. Immunol.**,**45**: 115-31,1997.

ANDERSEN,A . B., WORSAAE,A ., CHAPARAS,S.D. Isolation and characterization of recombinant lambda gt 11 bacteriophages expressing eight different mycobacterial antigens of potential immunological relevance. **Infect, Immun.** **56**; 1344-1351,1988.

ANDERSEN,A B., YUAN,Z.L., HASLOV,K., VERGMANN,B., BENNEDSEN,J. Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme - linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.****23**: 446-451,1986.

ANDERSEN,A.B., LJUNGQVIST,L. OLSEN,M. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. **J.Gen.Microbiol.** **136**: 477-480,1990.

ANDERSEN,A.B., LJUNGQVIST,L., HASLOV,K., BENTZON,M.W. MPB64 possesses Tuberculosis- complex specific B and T cells. **Scan. J. immunol.** **34**: 365-372,1991.

ARRUDA,S.,BOMFIM,G., KNIGHTS,R., HUIM-BYRON,T., RILEY,L.W. Cloning of na *M. Tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. **Science.** **261**:1454-1457,1993.

ARRUDA,S.; CHALHOUB,M.; CARDOSO,S.;BARRAL,M.N. Cell mediated immune responses and cytotoxicity to mycobacterial antigens in patients with tuberculous pleurisy in Brazil. **Acta Tropica**,1998.

AUGUSTIN, A., KUBO, T.R., SIM, K.G. Resident pulmonary lymphocytes expressing the gamma/delta T cell receptor. **Nature**, **340**: 239-241, 1989.

BARNES, P.F.; BLOOM, R.B.; BOYLEN, T.C.; LIN, Y.; IYER, D.; GONG, J.; MEHRA, V. Immune Response to Recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. **J. Infect. Dis.** **174**: 431-434, 1996.

BARNES, P.F., GRISSO, L.C., ABRAMS, S.J., BAND, H., REA, H.T., MODLIN, L.R. $\gamma\delta$ T lymphocytes in human tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, **165**: 506-512, 1992.

BARNES, P.F., MISTRY, D.S., COOPER, L.C., PIRMEZ, C., REA, H.T., MODLIN, L.R. Compartmentalization of CD4⁺ T lymphocyte subpopulation in tuberculosis peritonitis. **J. Immunol.**, **142**: 1114-1119, 1989.

BARNES, P.F.; ABRAMS, J.S.; LU, S.; SIELING, P.A.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Patterns of cytokine production by mycobacterium reactive human T cell clones. **Infect. Immun.**, **61**: 197-203, 1993a.

BARNES, P.F.; LU, S.; ABRAMS, J.S.; WANG, E.; YAMAMURA, M.; MODLIN, R.L. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. **Infect Immun.** **61**: 3482-3489, 1993b.

BERMUDEZ, L. E. M.; L.S. YOUNG. Natural Killer cell dependent mycobacteriostatic and mycobactericidal activity in human macrophages. **J. Immunol.**, **146**: 265-270., 1991.

BERMUDEZ, L.E. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium* infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN γ . **J. Immunol.** **150**: 1831-1845, 1993.

BERMUDEZ, L.E., KAPLAN, G. Recombinant cytokines for controlling mycobacterial infections. **Trends Microbiol.**, **3**: 22-26, 1995.

BERNARDINI,M.L., MOURNIER,J., D'HAUTEVILLE,H., COQUIS-RONDON,M., SANSONETTI,P.J. Identification of *ics A*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra and intercellular spread through interaction with F-actin. **Proc.Natl. Acad. Sci.****86** :3867-3871,1989.

BLISKA,J.B., BLACK,D.S. Inhibition of the Fc receptor- mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphate. **Infect. Immun.****63**:681-685,1995.

BLOOM ,B.R.,; MURRAY,C.J.L. Tuberculosis : commentary on a reemergent killer. **Science**,**257** : 1055-1064,1992.

BOOM,W.H., CHERVENAK,A K., MINCEK,A M., ELLNER,J.J. Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human $\gamma\delta$ T cells activated by live *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** **60**: 3480-3488,1992.

BRIGHT,J.J.; KERR, L.D.; SRIRAM,S. TGF- inhibits IL-2 induced tyrosine phosphorylation and activation of jak-1 and stat 5 in T lymphocytes. **J. Immunol.** **159**: 175-183,1997.

CASTRO, A .G.;N, ESAGUY.,P.M, MACEDO.,; A P AGUAS.,; M.T,SILVA. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and ingested by the attracted granulocytes . **Infect. Immun.**, **59**: 3009-3014,1991.

CHAN,J., XING,Y., MAGLIOZZO,S.R., BLOOM,R.B. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J. Exp. Med.** **175**:1111-1122,1992.

CHAN,J.; FAN,X.; HUNTER,S.W.; BRENNAN,P.J.; BLOOM,B.R. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. **Infect. Immun.** **59**: 1755-1761,1991.

CHITALE,S., KNIGHTS,R., COHEN-GOULD,L., RILEY,L.W. Purification and characterization of Mycobacterium tuberculosis cell entry protein (MCEP). **American Society for Microbiology**,1995.

CLEMENS,D.L.; HORWITZ,M.A. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.** **181**: 257-270,1995.

CLOSS,O; HARBOE,M., AXELSEN,N.H., BUNCH-CHRISTENSEN,K., MAGNUSSON,M. The antigens of Mycobacterium bovis, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system.**Scand.J. Immunol.** **12**(3) : 249-63,1980.

COHEN,I.R., YOUNG,D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. **Immunology Today.** **12**; 105-110,1991.

COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMEIER K, GAS S, BARRY CE 3RD, TEKAIA F, BADCOCK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K, KROGH A, MCLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, OSBORNE J, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, ROGERS J, RUTTER S, SEEGER K, SKELTON J, SQUARES R, SQUARES S, SULSTON JE, TAYLOR K, WHITEHEAD S, BARRELL BG. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**,**393**:537-544,1998.

COOPER,A . M., DALTON,D.K., STEWART,T.^a; GRIFFIN,J.P., RUSSELL,D.G., ORME,I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene- disrupted mice. **J. Exp.Med.** **178**: 2243-47,1993.

CZANIECKI,C.W.; CHIU,H.H.; WONG,W.H.; McCABE,M.S.; PALLOADINO,M.A . Transforming Growth Factor- β 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. **J.Immunol.** **140**: 4217-4223,1988.

DAHL,K.E.; SHITATSUCHI, HAMILTON,D.B.;ELLNER,J.J.; TOOSI,Z. Selective induction of transforming growth factor- β in human monocytes by lipoarabinomanna of *Mycobacterium tuberculosis* . **Infect. Immun.** **64**: 399-405.,1996.

DE BRUYN,J., HUYGEN,J., BOSMANS,R., FAUVILLE,M., LIPPENS,R., VAAN VOOREN.J.P., FALMAGNE,P., WECKX,M., WIKER,H.G., HARBOE,M., TURNEER,M. Purification, characterization and identification of a 32kD protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. **Microbial Pathogenesis.** **2**:351-366,1987.

DE WAAL MALEFYT,R; ABRAMS,J; BENNETT,B; FIGDOR,C.G; DE VRIES,J.E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: na autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.** **174**(5): 1209-20,1991.

DEL PRETE,G.; DE CARLI,M.; ALMERIGOGNA,F.; GIUDIZI,M.G.; BIAGIOTII,R.; ROMAGNANI,S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen- specific proliferation and cytokine production. **J. Immunol.**,**150**: 353-360,1993.

DING,A; NATHAN,F.C.; GRAYCAR.J; DERYNCK.; STUEHR,J.D.; SRIMAL,S. Macrophage deactating factor and transforming growth factors β 1 β 2 and β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN γ . **J. Immunol.****145**: 940,1990.

DOMANN, E.J., WHELAND,J., ROHDE,M. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with humology tothe proline-rich region of vinculin. **EMBO.J.** **11**:1981-1990,1992.

EDLIN, B.R., TOKARS, J.I, GRIECO,M.H., CRAWFORD, J.T.'WILLIAMS,J., SORDILLO,E.M., ONG,K.R., KILBURN,J.°, DOOLRY,S.W., CASTRO,K.G. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.** **326**(23): 1541-21,1992.

ÈNGERS,H.D., AND WORKSHOP PARTICIPANTS. Results of a world health Organizaton-sposored workshop tocharacterize antigens recognized by mycobacterium-specific monoclonal antibodies. **Infect. Immun.** **51**: 718-720,1986.

FINE,P.E.M. The BCG story : lessons from the past and implications for future. **Rev. Infect. Dis.**,**11** : S353-S359,1989.

FIORENTINO,D.F.;BOND,M.W.;MOSSMAM. Two types of mouse T helper cells.IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 170 : 2081-2095,1989

FLESCH, I.E., AND KUFMANN,E.H,. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. **Infect.Immun.** **59**:3213-3218,1991.

FLESH,I.E.A ; LOUFMANN,S.H.E. Activation of tuberculostatic macrophage function by IFN γ , IL-4 and TNF α . **Ifect. Immun.** **58**:2675-2677,1990.

FLYNN,J.L; CHAN,J; TRIEBOLD,K.J; DALTON,DK.; STEWART,T.A; BLOOM,B.R. Na essential role for interferon gammma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Exp. Med.**,**178**; 2249-54,1993.

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

HASLOV,K. ANDERSEN,A.B., LJUNGQVIST,L., BENTZON,M.W. Comparison of the immunological activity of five defined antigens from Mycobacterium tuberculosis in seven inbred guinea pig strains. The 38Kda antigen is immunodominat. **Scan. J. Immunol.** **31**:503-514,1990.

HAVLIR,D.V.;WALLIS,R.S.;BOOM,H.W.;DANIEL,M.T.;CHERVENAK,K.;ELLNER,J.J. Human immune response to Mycobacterium tuberculosis antigens. **Infect. Immun.**,**59**: 665-670,1991.

HIRSCH,C.S., ELLNER,J.J., BLINKHORN,R.,TOOSSI,Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor β . **Proc.Natl. Acad. Sci.**,**94**: 3926-3931,1997.

HIRSCH,C.S., HUSSAIN,R., TOOSSI,Z., DAWOOD,G., SHAHID,F.,ELLNER,J.J. Cross-modulation by transforming growth factor β in human tuberculosis : Suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon γ production. **Proc.Natl. Acad. Sci.**,**93** : 3193-3198,1996.

HO,J.L., RILEY,L.W. Defenses Against tuberculosis. **The Lung** : Scientific Foundations. 2^a Edição,1997.

HOWARD, M., AND O'GARRA,A .Biological properties of IL-10. **Immunol. Today**,**13** : 198-200,1992.

HSU,D. H.,MOORE,W.K.,SPITS,H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2 induced IFN gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. **Int. immunol.**,**4**: 563-569,1992.

HUSSON,R., YOUNG,R.A. Genes for the major protein antigens of Mycobacterium tuberculosis: The etiologic agent of tuberculosis and leprosy share an immunodominant antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **84**: 1679-1683,1987.

ISBERG,R.R., LEONG,J.M. Multiple 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. **Cell**.**60**: 861-871,1990.

JANIS,E.M., KAUFMANN,H.S., SCHWATZ,H.R., PARDOLL,M.D. Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**,**244**: 713-716,1989.

JOHNSON,B.J., ESTRADA,I., SHEN,Z., RESS,S., WILLCOX,P., COLSTON,J.M., KAPALN,G. Differential gene expression in response to adjunctive recombinant human interleukin-2 immunotherapy in multidrug-resistant tuberculosis patients. **Infect. Immun.** **66**: 2426-2433,1998.

JONES,B.E., YOUNG,M.M.S., ANTONISKIS,D., DAVIDSON, P.T., KRAMER,F. BARNES,F.P. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. **Am. Ver. Respir. Dis.**,**148**: 1292-1297,1993

KAUFMANN, S.H.E. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Imunol. Today.**, **9**: 168-174,1988.

KEHRL,J.H.; WAKEFIELD,M.L.; ROBERTS,B.^a; JAKOWLEW,S.;ALVAREZ-MON,M.; DERYNCK,R.; SPORN,B.M.; FAUCI,S.^a Production of transforming growth factor- β human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J. Exp.Med.****163**:1037-1050,1986.

KLINDER,V.S.^a; GRAU,G.E.; PIGUET,P.F.; VASSALI,P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**,**56**: 731-740,1989.

KOCH,R. Die Aetiologie der Tuberculose, a translation by Berna Pinner and max Pinner with an introduction by Allem K. Krause. **Am. Ver. Tuberc.**,**25** : 285-323,1932.

LAMB,J.R., IVANYI,J., REES,^aD.M., ROTHBARD,J.B., HOWLAND,K., YOUNG,R.^a YOUNG,D.B. Mapping of T cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides. **EMBO** **6**: 1245-1249,1987.

LATHIGRA,R.B., YOUNG,D.B., SWEETSER,D., YOUNG,R.A . A gene from Mycobacterium tuberculosis wich is homologous tothe DnaJ heat shock protein of E.coli. **Nucl. Acids Res. 16:** 1636,1988.

LEE,B.Y.,; HORWITZ,M.A . Identification of macrophage and stress- induced proteins of *Mvobacterium tuberculosis* . **American Society for Clinical Investigation.,96** : 245-249,1995.

LOZES,E., DENIS,O; DROWART,A; JURION,F., PALFLIET,K. VANONCKELEN,A; DE BRUYN,J; DE COCK,M; VAN VOOREN,J.P; HUYGEN,K. Cross-reactive immunu responses against Mycobacterium bovis BCG in mice infected with non-tuberculous mycobacteria belonging to the MAIS-Group. **Scand.J. Immunol.** 46(1): 16-26,1997.

LURIE MB, ZAPPASODI P. Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis. The fate of tubercule bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized animals. **J. Exp med., 75:** 247-67,1942.. 45.115-131,1997.

MANN,J.M.,; D.J.M.TARANTOLA.,;T.W.NETTER. AIDS in the World. Harvard University Press, Cambridge,Mass,1992.

MARINO,M.W.; DUNN,A; GRAIL,D.; INGLESE,M; NOGUCHI, Y.; RICHARDS, E.; JUNGBLUTH,A ; WADA,H.; MOORE,M.; WILLIAMSON,B.; BASU,S.; OLD,L.J. Characterization of tumor necrosis factor- deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.94:**8093-8098,1997.

MAY,M.E.; SPAGNUOLO,P.J. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with Mycobacterium tuberculosis. **Infect. Immun.,55** : 2304-2307,1987.

MEHRA,V., SWEETSER,D., YOUNG,R.A . Efficient mapping of protein antigenic determinants. **Proc. Natl. Acad.Sci. 83:** 7013-7017,1986.

MIDDLEBROOK,G. Tuberculosis and Medical Science. **Am. Rev. Respir. Dis.,125** : 5-7,1982.

MUNK,M.E., SHINNICK,T.M., KAUFMANN,S.H.E. Epitopes of the mycobacterial heat shock protein 65 for human T cells comprise different structures. **Immunobiol. 180**: 272-277,1990.

MURRAY,P.J., YOUNG,R. A. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. **J. Bacteriol. 174**; 4193-4196,1992.

MURRAY,P.J.; WANG,L.; ONUFRYK,C.; TEPPER,R.I.; YOUNG,R.A . T cell derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. **J. Immunol. 158**: 315-321,1997.

NAGAI,S., WIKER,H.G., HARBOE,M., KINOMOTO,M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. **Infect. Immun. 59**: 372-382,1991.

OHMEN,J.D., BARNES,F.P., UYEMURA,K., LU,S., GRISSO,L.C., MODLIN,L.R. The T cell receptor of human $\gamma\delta$ T cells reactive to Mycobacterium tuberculosis are encoded by specific V genes but diverse V-J junctions. **J. Immunol.50**: 361-362,1991.

ORME,I.M., MILLER,E.S., ROBERTS,^aD.,FURNEY,S.K., GRIFFIN,J.P., DOBONS,K.M., CHI,D., RIVOIRE,B., BRENNAN,P.J . T Lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Immunol. 148**: 189-196,1992.

POLLA,B.S. A role for heat shock proteins in inflammation. **Immunology Today 9**: 134-137,1988.

RAFFEL S. Types of acquired immunity against infectious disease. *Ann Ver Microbiol.*, 3: 221-264,1949.

RILEY LW. Determinants of cell entry and intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis. **Trends Microbiology**. 3 (1): 27-31, 1995.

SHINNICK,T.M., KRAT,C., SCHADOW,S. Isolation and restriction site maps of the genes encoding five Mycobacterium tuberculosis proteins. **Infect. Immun.** **55**: 1718-1721,1987.

SMITH, D.W. Protective effect of BCG in experimental tuberculosis. **Adv. Tuberc. Res.** **22** : 1-97,1985.

TAZI,A ., FAJAC,I., SOLER,P., VALEYRE,D., CADRANEL,J., BATTESTI,J.P., HANCE,J.A . Gamma/delta T lymphocytes are not increased in number in granulomatous lesions of patients with tuberculosis or sarcoidosis. **Am. Ver. Respir. Dis.** **144**: 1373-1375, 1991.

TAZI,A.,BOUCHONNET,F.,VALEYRE,D.,CADRANEL,J.,BATTESTI,J.P., HANCE,J.A . Characterization of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with active tuberculosis; a comparison with normal subjects and patient with sarcoidosis. **Am. Ver. Respir. Dis.** **146**: 1216-1221,1992.

TOOSSI,Z.; KLEINHERZ,M.E;ELLNER,J.J. Defective IL-2 production and responsiveness in human tuberculosis. **J. Exp.Med.**,**163**: 1162-72,1986.

TOOSSI,Z.;YUONG,T.;GOGATE,P.; SHIRATSUCHI,H.;ELLNER,J.J. Enhanced production of transforming growth factor $-\beta$ by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of transforming growth factor $-\beta$ in tuberculous granulomatous lung lesions. **J.Immunol.**,**154**: 465-473,1995.

TORRES,M.;HERRERA,T.; VILLAREAL,H.; RICH,AE.; SADA,E. **Infect.Immun.**,**66**:176-180,1998.

TSUNAWAKI,S.; SPORN,M.; DING,^a; NATHAN,C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . **Nature** **334**:260,1988.

VALONE,S.E.;RICH,E.A.;WALLIS,R.S.;ELLNERJ.J. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. **Infect.Immun.**,**56**: 3313 - 3315,1988.

WHO Global tuberculosis control; WHO report 1998 (WHO, Geneva,1998).

WIKER,H.G., HARBOE,M.,BENNESEN,J., CLOSS,O . The antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv,studied by crossed immunoelectrophoresis. Comparison with a reference system for *Mycobacterium bovis*,BCG. **Scand. J. Immunol.** **27**:223-239,1988.

WIKER,H.G., HARBOE,M.,LEA, T.E. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogenous BCG85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. **Int. Archs. Allergy appl. Immun.** **81**: 298-306,1986.

YAMAMURA,M.;BRENNANJ.P.; MODLIN,R.L. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannana; relationship to chemical structure. **J.Immunol.**,**307**:1593-1597,1992.

YOUNG,D.; KENT, L,R., RESS,A ; LAMB,J.;IVANYI,J.Immunological activity of a 38 Kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis* . **Infect.Immun.**54: 177-183,1986.

YOUNG,D., LATHIGRA,R., HENDRIX,R., SWEETSER,D. YOUNG,R.A . Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **85**: 4267-4270,1988.

YOUNG,D.B., GARBE,T.R. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect.Immun.****59**: 3086-3093,1991.

YOUNG,D.B., GARBE,T.R. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Res. Microbiol.** **142**:55-65,1991.

YOUNG,D.B., KAUFMANN,S.H.E., HERMANS, P.W.M., THOLE,J.E.R.Mycobacterial protein antigens: a compilation. **Mol. Microbiol. 6**: 133-145,1992.

YOUNG,R.^a, MEHRA,V., SWEETSER,D., BURCHANAN,T CLARK-CURTISS,J., DAVIS,R.W., BLOOM,B.R. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. **Nature. 316**: 450-452,1985.

ZHANG,M.; LIN,Y.; IYER,D.V; GONG,J.; ABRAMS,J.S.; BARNES,P.F. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun. 63**: 3231-3234,1995.

PUBLICAÇÃO