

Doenças Negligenciadas: Doenças Micobacterianas

Neglected Diseases: Mycobacterial Diseases

José R. Lapa e Silva

Faculdade de Medicina/Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, RJ, Brasil

As duas mais antigas Faculdades de Medicina do Brasil, a Faculdade de Medicina da Bahia e a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) completam seu Bicentenário em 2008. Ambas têm uma longa tradição de ensino e pesquisa em tuberculose (TB), uma doença negligenciada, como a hanseníase e a malária. Nos últimos 15 anos, a Unidade de Pesquisa em TB da UFRJ tem-se empenhado em suplantando esta negligência. Contribuiu para a criação da Rede Brasileira de Pesquisa em TB e estabeleceu parcerias com Universidades no Brasil e nos Estados Unidos, que permitiram o avanço do conhecimento em muitos campos, inclusive nos mecanismos de desenvolvimento da doença. Um dos aspectos mais intrigantes da patogenia da TB é o estado de imunossupressão relativo que acompanha seu desenvolvimento. Portadores de TB apresentam inibição da proliferação de linfócitos T, produção reduzida de IL-2 e ausência de reatividade cutânea à tuberculina. Evidências clínicas e experimentais sólidas indicam que IL-10 e TGF- β desempenham um papel importante nesta alteração funcional. O complexo *milieu* de citocinas existente nos tecidos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*, particularmente nos pulmões, influencia a expressão de moléculas co-estimulatórias e de moléculas MHC Classe II, interferindo no desfecho da resposta imunitária contra o bacilo. Tais idéias levaram nosso grupo a desenvolver uma estratégia de pesquisa para entender a cinética da participação de citocinas imuno-regulatórias, desde a fase de diagnóstico da infecção ativa, durante e ao final da quimioterapia específica, através do escarro induzido seriado. **Palavras-chaves:** doenças negligenciadas, tuberculose, imuno-regulação, citocinas, receptores.

The two oldest Schools of Medicine in Brazil, Faculdade de Medicina da Bahia and Faculdade de Medicina of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) celebrate their Bicentennial in 2008. Both have a long tradition in teaching and research in tuberculosis (TB), a neglected disease as leprosy and malaria. Over the last 15 years, the TB Research Unit/UFRJ has worked to overcome this neglect in Brazil. It contributed to the creation of the Brazilian TB Research Network and established partnerships with Brazilian and US Universities that resulted in new information in many fields related to TB, including its pathogenesis. One of the most intriguing aspects of TB pathogenesis is the state of relative immunosuppression that accompanies the development of the disease. TB patients suffer inhibition of T lymphocyte proliferation, reduced secretion of interleukin-2 and inhibition of skin reactivity to tuberculin. Sound clinical and laboratory evidences indicate that IL-10 and TGF- β have important role in this dysfunctional immune state. The complex milieu of cytokines present locally in tissues infected by Mycobacterium tuberculosis particularly in the lungs influence the expression of costimulatory MHC Class II molecules, interfering in the outcome of the immune response against the bacilli. Such ideas lead our group to develop a strategy to understand the kinetics of participation of immune regulatory cytokines in the lungs of TB cases, from the early phase of diagnosis to the end of anti-TB treatment, using serial sputum induction.

Key words: Neglected diseases, tuberculosis, immune regulation, cytokines, receptors.

Bicentenário da FAMEB

É com emoção e orgulho que me associo às celebrações do Bicentenário da Faculdade de Medicina da Bahia (FAMEB), em 18 de fevereiro de 2008, no bojo das comemorações dos 200 anos da chegada da Família Real Portuguesa ao Brasil em 1808. Esta data marca também o

Recebido em 20/12/2007 Aceito em 25/01/2008
Endereço para correspondência: Dr. José R. Lapa e Silva. Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, Avenida Professor Rodolpho Paulo Rocco, 255, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 21951-913. Telefone/FAX – 55 21 2562-2669. Endereço eletrônico: jrlapa.ntg@terra.com.br. FINANCIAMENTOS- Instituto do Milênio CNPq 420121/2005-6, FAPERJ E-26/152.469/2002, Fogarty International Center-NIH (AITRP-D43 TW00018, ICOHRTA-5 U2R TW006883).

Gazeta Médica da Bahia 2008;78 (Suplemento 1):80-85.
© 2008 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

início do Ensino Superior no país. Mais um grande motivo de minha enorme alegria é também a coincidência de outras comemorações, os 200 anos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), à qual estou associado desde 1968, a ser celebrado em 5 de novembro de 2008, e os 30 anos do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, no dia 01 de março de 2008.

A Escola de Cirurgia do Rio de Janeiro foi criada por Carta Régia em 05 de novembro de 1808, com a nomeação do Cirurgião Joaquim José Marques como Lente do Curso de Ligaduras, Partos e Operações de Cirurgia. Desde então teve os nomes de Academia Médico-Cirúrgica, Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro, Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil e desde 1965, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (GOMES, M.M.; VARGAS, S.S.M.; VALLADARES, A.F.,

2001). Mas para gerações de médicos formados nos últimos 50 anos, ela sempre será a Nacional de Medicina.

Doenças Micobacterianas Negligenciadas

Coube-me, nesta seleta mesa-redonda sobre Doenças Negligenciadas, o tema Doenças Micobacterianas. O termo doenças negligenciadas é geralmente utilizado para as doenças de alto impacto social em grande parte do planeta, mas que, por tipicamente afetar países em desenvolvimento, e nestes, as populações mais empobrecidas, não desperta o interesse da indústria farmacêutica e de insumos biológicos, e mesmo dos meios acadêmicos. O termo Doenças Negligenciadas se aplica, por exemplo, para três das doenças infecciosas de maior prevalência no mundo, a tuberculose, a hanseníase e a malária. As duas primeiras são provocadas por espécies do gênero *Mycobacterium*, tema desta conferência.

A hanseníase, ou *Morbus Hansen* (MH), é longamente associada à história da humanidade. No início da 2007, a prevalência global de MH permanecia em 225.000 casos, enquanto em 2006 foram detectados cerca de 260.000 casos, um decréscimo de cerca de 13% em relação ao ano anterior (WHO, 2007a). A terapia com fármacos combinados e dispensados de graça, o acesso à informação e aos meios diagnósticos permitiram este decréscimo importante do número de casos. A meta é a eliminação da doença como um problema de saúde pública, definida como uma prevalência inferior a 1 caso por 10.000 habitantes. O Brasil continua ainda um dos locais de alta endemicidade da doença, particularmente na Região Amazônica.

Nos últimos 30 anos tenho-me dedicado à pesquisa e treinamento de recursos humanos em tuberculose e é sobre ela que me disponho a falar hoje. Passados 125 anos da descrição do agente etiológico por Robert Koch, a tuberculose continua a assombrar a humanidade. Os dados estimados para 2005 relativos à incidência, prevalência e mortalidade globais foram de 136, 217 e 24 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (WHO, 2007b). Ocorreram naquele ano mais de 8.800.000 casos novos e 1.500.000 mortes totalmente evitáveis. O Sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental e a África contribuem com 88% dos casos. Apesar das Américas apresentarem apenas 4% dos casos do mundo, o Brasil e o Peru notificaram 50% dos casos do Hemisfério Ocidental, sendo nosso país colocado em 16º. lugar entre os 22 países que apresentam 80% dos casos de tuberculose. Desde 1993 a tuberculose foi declarada uma emergência sanitária global pela Organização Mundial da Saúde (KRITSKI *et al.*, 2006). Até então, pouquíssima atenção era dada a esta doença pela academia, indústria e organismos multilaterais. Soma-se a isso, particularmente no Brasil, o desmantelamento dos serviços de saúde no início dos anos Noventa, com a implantação de políticas neo-liberais pelo Governo Collor e também como consequência da Reforma Sanitária.

A Luta contra a Negligência no Combate à Tuberculose

A Universidade Federal do Rio de Janeiro, assim como a Universidade Federal da Bahia, tem uma longa tradição de

estudo da tuberculose, vindo desde os anos 30 do século XX. Um famoso médico baiano emigrado para o Rio de Janeiro, Prof. Clementino Fraga, tinha grande interesse pelo estudo da Tisiologia. Dois dos seus filhos fizeram brilhante carreira acadêmica, Clementino Fraga Filho, decano da Faculdade de Medicina e que preside, do alto dos seus 90 anos, as celebrações pelos 30 anos do hospital que leva o seu nome, e Prof. Helio Fraga, brilhante tisiologista e que muito contribuiu para recolocar a tuberculose no mapa. Em 1957, a então Universidade do Brasil criou o Instituto de Tisiologia e Pneumologia para abrigar a primeira Cátedra de Tisiologia do Brasil, ocupada após brilhante concurso em 1951 pelo Professor Antonio Ibiapina. A ele sucedeu o Prof. Newton Manhães Bethlem, já no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, grande Tisiologista e meu mentor. Ao aluno coube a honra de suceder o mestre, quando assumi o cargo de Professor Titular da Disciplina de Pneumologia em 1997.

Mas antes disso, ao retornar ao Brasil em 1993 após longos anos na Europa, convidei o então jovem Tisiologista Afrânio Kritski a se transferir do Instituto de Tisiologia e Pneumologia para o Hospital Universitário, a fim de que pudéssemos organizar um setor de pesquisa em tuberculose, praticamente inexistente então no Rio de Janeiro. Pretendíamos assim terminar com a negligência que cercava a tuberculose, pelo menos em nossa Universidade. Para isso contamos com o apoio de um outro personagem profundamente ligado à Bahia, o Prof. Warren D. Johnson, Jr., Professor de Medicina Tropical da Universidade Cornell de New York e Doutor *Honoris Causa* da FAMEB/UFBA. Outros dois colegas da Cornell, Dr. Lee W. Riley, hoje em Berkeley, e Dr. John L. Ho foram também parceiros nesta empreitada. Ainda em 1993 iniciamos uma profícua colaboração que persiste até hoje. Em 1995, criamos a Unidade de Pesquisa em Tuberculose do HUCFF/UF RJ e já em 1997 começamos a participar de projetos financiados pelos *National Institutes of Health* dos Estados Unidos, em parceria com a Cornell, como AITRP, ICIDR, em parceria com a Universidade Johns Hopkins, e ICOHRTA, agora em associação com Cornell, Johns Hopkins e Berkeley.

Mas a mais importante das nossas iniciativas foi a fundação, em 2001, da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose, REDE-TB, organização que reúne 170 pesquisadores de todas as áreas do conhecimento interessados em tuberculose. A missão da REDE-TB é a capacitação científica e tecnológica no país para o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos e colaborar na revisão de políticas públicas necessárias ao controle da tuberculose. O fulcro da atividade é a geração e difusão de conhecimentos em tuberculose. Como nas colaborações com as universidades americanas, a pesquisa norteia ações de formação de recursos humanos, nas áreas de pós-graduação tanto *stricto sensu* como *lato sensu*. Desde 2002 exerceo a função de coordenador da área de recursos humanos da REDE-TB, com a missão de formar recursos humanos de alto nível para o controle da tuberculose. O modelo de intervenção da Coordenação de Recursos Humanos da REDE-TB é o

modelo piramidal, em quatro níveis, sendo a base composta de atividades de motivação para a pesquisa, de onde serão recrutados os candidatos à formação nos demais níveis, chegando até o topo, destinado aos cursos de pós-graduação formais.

O mesmo modelo foi empregado na proposta vitoriosa que competiu para o programa ICOHRTA AIDS/TB (*International Clinical, Operational, and Health Services Research Training Award for AIDS and Tuberculosis*) financiado pelo *Fogarty International Center/NIH*, que visa desenvolver treinamento em pesquisa multidisciplinar em AIDS e TB. Nos primeiros dois anos do projeto, de outubro de 2005 a dezembro de 2007 foram treinados 959 alunos nos diversos níveis.

Resultados das diversas ações descritas acima não tardaram a aparecer. Estudo recentemente publicado por nosso grupo (KRITSKI *et al.*, 2007) demonstrou um aumento do número de tese e artigos indexados tendo tuberculose como tema principal nos últimos anos. Buscamos artigos indexados no *Medline* e no *Scielo* contendo a palavra tuberculose e autores afiliados a instituições brasileiras, bem como dissertações e teses no banco da CAPES. Houve dois marcos no número de artigos internacionais: um em 1995, quando passaram de 10/ano, e 2000, quando passaram de 30/ano. As publicações, essencialmente relatos de caso e revisões inicialmente, passaram a incluir artigos originais em ciência, tecnologia e inovação científica. Estas mudanças podem refletir o incremento das atividades de pesquisa nas instituições acadêmicas e novas atitudes relativas aos objetivos da pesquisa em tuberculose nos últimos anos.

Apesar de um grande incremento nos investimentos em pesquisa em tuberculose desde meados da década passada, seja por organismos governamentais, multilaterais e grandes filantropos, a indústria farmacêutica permanece praticamente ausente do cenário da pesquisa em TB (FEUER, 2006). Estima-se que sejam necessários investimentos da ordem de 9 bilhões de dólares pelos próximos dez anos para compensar o atraso científico, e sem a indústria tal nível de investimento não será atingido.

Além das atividades políticas e organizacionais descritas anteriormente, as colaborações com a Universidade Cornell resultaram em avanços do conhecimento na área de imunopatogenia da tuberculose pulmonar e na genética molecular da micobactéria. A limitação de tempo não me permitirá abordar estas duas áreas em profundidade, assim vou me ater nesta parte final aos resultados envolvendo os estudos de imunologia pulmonar.

Imunopatogenia da Tuberculose Pulmonar

O *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb.) infecta aproximadamente um terço da população mundial, porém a infecção não significa necessariamente que o indivíduo vá desenvolver a forma ativa da doença, permanecendo assim, em mais de 80% dos casos, em estado de latência

(“dormência”). Este enorme reservatório de pessoas portadoras da forma latente da doença constitui um desafio à saúde pública mundial para o qual até hoje não há perspectiva de solução. É deste reservatório que sairão os casos ativos e contagiosos, que perpetuarão o ciclo da infecção-doença-infecção. A TB continuará a assombrar, assim, a humanidade pelos próximos decênios. Várias razões contribuem para esta realidade. A primeira e mais importante é sua associação com as baixas condições sócio-econômicas da maioria dos seus portadores e das nações onde eles vivem. Apesar da doença ter distribuição mundial e de todas as nações notificarem casos de tuberculose, mais de 80% destes casos se concentram em 22 países, como citado anteriormente, todos com renda média ou baixa, no conceito do Banco Mundial. Nestes países, a grande maioria dos casos, por sua vez, ocorre em pessoas abaixo da linha de pobreza.

A resistência natural contra a TB parece estar relacionada com a maior ou menor velocidade com que o hospedeiro infectado é capaz de desenvolver sua resistência adquirida. Os fatores que diminuem a capacidade de desenvolver resistência ao M.tb são a desnutrição, o alcoolismo, a silicose, o diabetes melito, a paracoccidiodomicose, a gastrectomia e as condições de imunossupressão por doenças ou drogas (KRITSKI *et al.*, 2006). Em granulomas de pacientes com tuberculose latente, há uma predominância de citocinas do tipo 1 (Th1), com grande expressão de interferon-gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1-beta (IL-1 β) e enzimas como Óxido Nítrico Sintase Indutível (NOS2 ou iNOS), e baixa expressão de IL-4. Estas características são fundamentais para a indução e manutenção da latência. A tuberculose pode tornar-se reativa devido a uma falta de ativação dos macrófagos pelo IFN- γ (ARRIAGA *et al.*, 2002).

Um dos aspectos mais intrigantes da patogenia da TB é o estado de imunossupressão relativo que acompanha o desenvolvimento da forma ativa da TB. Enquanto a grande maioria de indivíduos infectados, mas não doentes, exibe uma forte reação de hipersensibilidade retardada aos antígenos de M.tb., pacientes com a forma ativa da TB apresentam inibição da proliferação de linfócitos T, produção reduzida de IL-2 e ausência de reatividade cutânea à tuberculina ou anergia tuberculínica (ELLNER, 1978; SCHAUF *et al.*, 1993; SENDIDE *et al.*, 2005). Evidências clínicas e experimentais sólidas indicam que IL-10 e Fator de Transformação e Crescimento beta (TGF- β) desempenham um papel importante nesta alteração funcional (HIRSCH *et al.*, 1996; MURRAY, P.J.; YOUNG, R.A., 1999). Um outro aspecto relacionado à imunodepressão relativa nos casos ativos de TB é a diminuição de expressão do antígeno leucocitário humano (HLA)-DR e de CD86 em macrófagos e células dendríticas (APCs). O complexo *milieu* de citocinas existente localmente nos tecidos infectados pelo M.tb. influencia a expressão de moléculas co-estimulatórias e de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) Classe II, interferindo de modo significativo no desfecho da resposta

imunitária contra o bacilo. A presença de níveis localmente aumentados de IL-10 poderia favorecer o estabelecimento de disfunção imune nos tecidos infectados pelo bacilo, resultando em regulação negativa da expressão de moléculas MHC Classe II (SENDIDE *et al.*, 2005) e de CD86, CD40 e CD54 (BARRERA *et al.*, 2004) em APCs. Este fenômeno foi até mesmo observado em voluntários normais portadores de infecção tuberculosa latente (indivíduos PPD+) (BARRERA *et al.*, 2004). Evidências oriundas de modelos animais indicam que diferentes espécies micobacterianas podem inibir a expressão de MHC Classe II (FULTON, S.A.; REBA, S.M.; PAL, R.K., 2004) e CD86 (BONATO *et al.*, 2001) em macrófagos. Já a ativação da sinalização via CD40 em APCs torna a resposta antimicobacteriana mais ativa (DEMANGEL *et al.*, 2001). Ao contrário, a ausência de engajamento adequado de CD28 ou a ativação aumentada de CD152 poderia tornar a célula T anérgica e contribuir para a disfunção imune relativa (SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J., 2002).

Existem indícios de que a imunossupressão tenha a ver com a capacidade do *Mycobacterium* de manipular a reação imune do hospedeiro a seu favor, funcionando como um mecanismo de evasão que permite ao bacilo se estabelecer e também evoluir para a forma ativa da doença. A proteção imune contra a tuberculose envolve vários elementos da imunidade celular, especialmente os macrófagos e os linfócitos T, que desempenham um papel crítico em limitar a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, vários fatores que mediam a suscetibilidade e a resistência específica à micobactéria permanecem desconhecidos. O papel de citocinas no *milieu* local de desenvolvimento da infecção é central ao processo, visto que as funções dos macrófagos e linfócitos T são influenciadas por elas. Há muito se sabe que, em modelos experimentais de tuberculose em camundongos, o controle da carga bacilar infectante se segue ao desenvolvimento de clones de linfócitos T CD4+ que produzem IL-2, capaz de induzir proliferação e ativação de outros linfócitos T e de interferon- γ , que induz a ativação dos mecanismos microbicidas intra-celulares dos macrófagos (ORME *et al.*, 1993). Várias evidências da literatura também indicam que tais mecanismos são atuantes nos humanos (GEROSA *et al.*, 1999). Pelo menos no modelo murino, o mecanismo de controle intra-celular da micobactéria envolve a regulação positiva da enzima iNOS, que produz intermediários reativos de nitrogênio, altamente eficazes contra a micobactéria (DARWIN *et al.*, 2003). Nosso grupo foi o primeiro a demonstrar a expressão funcional da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico *in situ* nos pulmões de portadores de tuberculose ativa, mas o papel desta enzima no controle da tuberculose em humanos permanece a ser elucidado (NICHOLSON *et al.*, 1996). A importância do IFN- γ no controle da tuberculose em humanos tem sido atestada pela grande suscetibilidade à infecção por micobactérias em pessoas que apresentam uma mutação em um dos componentes do receptor para IFN- γ que o torna disfuncional (JOUANGUY *et al.*, 1996). Portanto, um elemento chave da

resposta protetora contra a tuberculose envolve a secreção sincronizada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e citocinas do eixo IFN- γ /IL-12/IL-23 (KINDLER *et al.*, 1989; OTTENHOFF *et al.*, 2005; SALGAME, 2005). Isto é bem evidente pelo aumento na suscetibilidade às micobacterioses ou TB ativa em indivíduos tratados com antagonistas de TNF- α ou naqueles contendo mutações em genes essenciais às funções efetoras imunes, como IFN- γ , IL-12, *NRAMP1*, TLR2 e MCP-1 (CARAGOL *et al.*, 2003; FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2005; GREENWOOD *et al.*, 2000; MALIK, 2005; OGUS *et al.*, 2004). Para proteger contra excesso de dano motivado por estas citocinas pró-inflamatórias, a secreção de citocinas com ação anti-inflamatória como TGF- β e IL-10 é essencial no processo. No entanto, se estas citocinas anti-inflamatórias estiverem desproporcionalmente representadas no início do processo imune anti-tuberculose, elas poderão contribuir para a supressão da resposta protetora, mesmo na presença das citocinas pró-inflamatórias. As interações que sustentam a imunidade não-esterilizante permanecem, no entanto, desconhecidas. Estudos com células imunes do sangue periférico sugerem que em indivíduos saudáveis com TB latente as células respondem a antígenos de *M. tuberculosis* com produção de IFN- γ , enquanto células de portadores de TB ativa têm uma resposta predominantemente Th0 ou Th2 (ROOK, D.R.; DHEDA, K.; ZUMLA, A., 2005; TORRES *et al.*, 1998).

Os mecanismos pelos quais a imunossupressão relativa ocorre em diversas etapas da tuberculose ativa começam a ser desvendados. Nosso grupo demonstrou a presença de IL-10 e de TGF- β imunorreativo em quantidades elevadas, e co-expressão dos receptores I e II de TGF- β no lavado broncoalveolar (LBA) de portadores de tuberculose (BONECINI *et al.*, 2004). Níveis de IFN- γ e IL-10 estão elevados no fluido de LBA de TB, comparado com controles com outras pneumopatias e voluntários saudáveis. A atividade de TGF- β está elevada nos fluidos do LBA de portadores de TB.

No período de março de 1998 a março de 2001 foram submetidas à indução de escarro 172 pessoas que se apresentaram aos ambulatórios do serviço de Pneumologia do HUCFF com os sinais e sintomas sugestivos de tuberculose. Trinta e quatro indivíduos portadores de tuberculose aceitaram participar e foram incluídos neste estudo longitudinal, após assinarem o TCLE, em que foram submetidos a novas induções de escarro nos seguintes tempos após a introdução da quimioterapia anti-tuberculose: 15, 30, 60 e 180 dias. Três projetos resultaram da constituição desta coorte.

No primeiro trabalho (FLORES-BATISTA *et al.*, 2007), o escarro coletado no momento do diagnóstico foi investigado para a expressão de moléculas relacionadas à apresentação antigênica por células apresentadoras de antígenos e de moléculas co-estimulatórias. Moléculas co-estimulatórias e células dendríticas desempenham função importante na imunidade mediada por linfócitos T. Muitos aspectos de sua participação na tuberculose pulmonar em humanos

permanecem obscuros. Este estudo analisou a expressão de moléculas co-estimulatórias e de células dendríticas em células broncopulmonares de pessoas com TB obtidas por indução de escarro. Portadores de TB (n=22) e controles sem TB (n=17) foram incluídos. Realizou-se a imunolocalização de moléculas co-estimulatórias (CD86, CD40, CD40L, CD28 e CD152) e de células dendríticas (Classe II do MHC/HLA-DR, CD1a). A coloração por HLA-DR mostrou positividade em 18/22 casos de TB e em 16/17 controles (p=0,36). Uma redução estatisticamente significativa no número de células HLA-DR+ foi encontrada nos casos de TB (p<0,001). A coloração para CD86 mostrou baixa positividade em casos de TB (10/22) comparada aos indivíduos controles (16/17) (p=0,042) e uma diminuição estatisticamente significativa nas porcentagens de células CD86+ foi também vista (p=0,042). Pacientes com doença radiologicamente limitada (afetando < 1 lobo) mostraram uma redução estatisticamente significativa na expressão de CD86 (p=0,021) comparados com pessoas apresentando formas pulmonares mais avançadas (afetando > 1 lobo). Não se observaram diferenças estatísticas na frequência das colorações positivas para CD1a, CD40, CD40L, CD28 e CD152 entre grupos TB e controles. HLA-DR e CD86, duas moléculas envolvidas em apresentação de antígeno e ativação de linfócitos T encontram-se diminuídas nos pulmões de pessoas com TB. Estes achados podem explicar, pelo menos em parte, a disfunção imune vista na TB ativa, particularmente na fase inicial do desenvolvimento da doença.

No segundo trabalho (LAGO *et al.*, 2005, 2007), dos trinta e quatro indivíduos portadores de tuberculose incluídos no estudo longitudinal, quatro foram excluídos por ter-se determinado soropositividade para o HIV após a sua inclusão. Dos trinta que completaram o protocolo, nove indivíduos foram excluídos por insuficiência de material para a execução das dosagens pelo método de ELISA. Assim, 21 portadores de tuberculose que completaram o protocolo de estudo e apresentaram material broncopulmonar à indução de escarro nos pontos pré-determinados (momento de diagnóstico, tempos 15, 30, 60 e 180 dias de tratamento) foram avaliados através de dosagens seriadas das concentrações de IL-10 e interferon-gama no sobrenadante do escarro. IL-10 e IFN- γ foram vistos em todos os pontos temporais estudados. Níveis de IL-10 desceram em paralelo à curva de negatificação bacteriológica do escarro até T60. Entre T60 e T180, dois padrões diferentes foram vistos: no Padrão 1 (n=7), os níveis de IL-10 voltaram a subir; no Padrão 2 (n=13) os níveis de IL-10 decresceram ainda mais ou se mantiveram estáveis. Em agosto de 2005, todos os 21 indivíduos foram contactados pela equipe de estudo, sendo que 20 foram encontrados e responderam a novo questionário, visando determinar que tipos de eventos sanitários eles apresentaram neste período de evolução após o tratamento para tuberculose. Destes, seis (30%) apresentaram um segundo episódio de tuberculose, sendo que desses, três apresentavam história de tuberculose no passado (um desses teve um outro episódio após o fim do acompanhamento de 180 dias do protocolo). O tempo médio

de seguimento foi de $69,8 \pm 1,3$ meses. Durante o seguimento, 5/7 indivíduos com Padrão 1 apresentaram pelo menos um segundo episódio de TB, comparado a 1/13 em casos de Padrão 2 [OR: 3,0 (1,59-13,27), p=0,007]. Não houve associação similar com IFN- γ . O nível de IL-10 no escarro de 180 dias nos casos que recidivaram foi significativamente maior que dos casos sem recidiva. A presença de altos níveis de IL-10 ao final do tratamento poderia funcionar como um fator de risco para recaídas de TB.

Ainda utilizando a mesma coorte de portadores de tuberculose, acompanhados ao longo do tratamento mediante a indução de escarro nos tempos previamente estabelecidos, o terceiro trabalho aplicou o método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time PCR*) para analisar a expressão de mRNA em lisados de células broncopulmonares para o gene constitutivo GAPDH e para 17 genes envolvidos em imunorregulação (TNF- α , IL-10, IL-12p35 & p40, IFN- γ , TGF- β RI & RII, IL-1Rn, CD80, CD86, Socs3, Socs1, TLR2, IRAK-M, NEMO, IDO e IL23). Tal expressão foi estudada em 30 portadores de TB, 11 portadores de outras pneumopatias (OLD) e 16 voluntários saudáveis (HCW) antes e após o início da quimioterapia para TB. Amostras de células pulmonares foram coletadas através do escarro induzido. Os resultados demonstraram que antes da quimioterapia houve predominância da expressão das seguintes citocinas anti-inflamatórias, inflamatórias, receptores e genes reguladores de supressão da resposta imune em TB: IFN- γ , IL-12p35, IL-12p40, TLR2, IRAK-M, IL-1Rn, TGFRI e TGF β RII, IDO, IL-10, SOCS3 e SOCS1, comparados a OLD e HCW (p<0,05, Kruskal-Wallis). Dos mediadores imunológicos avaliados a partir de 15º dia de tratamento, mantiveram-se com expressão significativa ao final do tratamento SOCS1, SOCS3, TLR2, IRAK-M, IL-12p35, IL-12p40, NEMO e IFN- γ , quando comparados aos grupos controles. Portanto, antes do tratamento, a expressão de citocinas inflamatórias e o grau de ativação das células presentes no meio pulmonar foram contrabalançados pela expressão de fatores desativadores. Eles podem estar envolvidos na supressão da resposta imune, resultando na TB ativa. Associado a isto, após início da quimioterapia e redução da carga bacilar, citocinas anti-inflamatórias, receptores e outros fatores (IL-10, TGF β -RI, TGF β -RII, NEMO, TLR2, IDO) e genes regulatórios supressivos (SOCS1, SOCS3) aumentaram sua expressão. Isto pode contribuir para a contenção da inflamação pulmonar excessiva, limitando o dano tecidual. Alternativamente, pode facilitar a recidiva da tuberculose em pacientes susceptíveis (manuscrito em preparação).

Outro importante estudo publicado com nossa parceria (STERLING *et al.*, 2007) analisou várias citocinas e quimiocinas, desta vez no sangue periférico de crianças até cinco anos de idade que tiveram tuberculose disseminada, como meningite tuberculosa ou tuberculose miliar, tuberculose pulmonar sem evidência de disseminação, todas já curadas após tratamento adequado, que foram comparadas com crianças infectadas mas não doentes, caracterizadas por teste

cutâneo positivo ao PPD. Células mononucleadas do sangue periférico foram cultivadas em diversas condições *in vitro* e os sobrenadantes usados para medição das citocinas. O único fator significativamente diferente foi MCP-1, que estava muito aumentado em relação aos controles em crianças curadas de tuberculose pulmonar. Já as crianças com tuberculose disseminada apresentavam queda substancial nos valores de MCP-1.

Os dados apresentados abrem caminho para o desenvolvimento de novos insumos para o diagnóstico rápido da tuberculose, assim como a identificação de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas vacinas e novos fármacos contra a tuberculose e quem sabe poderemos sonhar, ainda em nossas vidas, com o controle e erradicação da tuberculose do planeta.

Referências

- ARRIAGA, A.K. *et al.* Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 128: 229-237, 2002.
- BONATO, V.L. *et al.* Down-modulation of CD18 and CD86 on macrophages and VLA-4 on lymphocytes in experimental tuberculosis. *Scand J Immunol* 54: 564-73, 2001.
- BONECINI ALMEIDA, M.G. *et al.* Down-Modulation of Lung Immune Response by IL-10 and TGF- β Ligands and TGF- β receptors I and II in Active Tuberculosis. *Infect Immun* 72: 2628-2634, 2004.
- CARAGOL, I. *et al.* Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor b1 deficiency. *Clin Infect Dis* 37: 302-306, 2003.
- DARWIN, K.H. *et al.*, The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science*. 302: 1963-1966, 2003.
- DE LA BARRERA, S. *et al.*, IL-10 down-regulates costimulatory molecules on *Mycobacterium tuberculosis*-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol* 138: 128-38, 2004.
- DEMANGEL, C. *et al.* Stimulation of dendritic cells via CD40 enhances immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 69: 2456-61, 2001.
- ELLNER, J.J. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol* 121: 2573-2579, 1978.
- FEUER, C. Tuberculosis Research & Development. A critical analysis. 1a. edição. New York: Treatment Action Group, 73 p., 2006.
- FLORES-BATISTA, V.C. *et al.* Low expression of antigen-presenting and costimulatory molecules by lung cells from tuberculosis patients. *Braz J Med Biol Res* 40: 1671-1679, 2007.
- FLORES-VILLANUEVA, P. *et al.* A functional promoter polymorphism in monocytes chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med* 202:1649-1658, 2005.
- FULTON, S.A. *et al.* Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun* 72: 2101-2110, 2004.
- GEROSA, F. *et al.* CD4 (+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Immunol* 92: 224-234, 1999.
- GREENWOOD, C.M. *et al.* Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet* 67: 405-416, 2000.
- HIRSCH, C.S. *et al.* Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3193-3198, 1996.
- JOUANGUY, E. *et al.* Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med* 335: 1956-1961, 1996.
- KINDLER, V. *et al.* The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granuloma during BCG infection. *Cell* 56: 731-40, 1989.
- KRITSKI, A.L. *et al.* Tuberculose: do Ambulatório à Enfermaria. 3ª. Edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 259 p., 2006.
- _____. Two decades of research on tuberculosis in Brazil: state of the art of scientific publications. *Rev Saude Publica* 41 Suppl: 9-14, 2007.
- LAGO, P.M. *et al.* Role of regulatory cytokines and inducible nitric oxide synthase (NOS) in active tuberculosis. In: *Proceedings American Thoracic Society* May 20-25, San Diego, EUA, 2:A57, 2005.
- _____. Increased Levels of Sputum IL-10 at the End of Anti-Tuberculosis (TB) Chemotherapy Is a Marker for Relapse. In: *Proceedings Am. Thor. Soc* 20-24 de maio, San Francisco, EUA, 4:A820, 2007.
- MALIK, A.N.J.; Godfrey-Faussett, P. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 5: 174-183, 2005.
- GOMES, M.M.; VARGAS, S.S.M.; VALLADARES, A.F. A Faculdade de Medicina Primaz do Rio de Janeiro em dois dos cinco séculos de história do Brasil. 1ª. Edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 258 p., 2001.
- MURRAY, P.J.; YOUNG, R.A. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 67: 3087-3095, 1999.
- NICHOLSON, S. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.* 1996; 183:2293-2302.
- OGUS, A.C. *et al.* The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 23: 219-223, 2004.
- ORME, I.M. *et al.* Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 151: 518-525, 1993.
- OTTENHOFF, T.H.M. *et al.* Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis* 85: 53-64, 2005.
- ROACH, D.R. *et al.* TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-4627, 2002.
- ROOK, G.R.A.W.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nature Rev Immunol* 5: 661-667, 2005.
- SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 17: 374-380, 2005.
- SCHAUF, V. *et al.* Cytokine gene activation and modified responsiveness to IL-2 in the blood of tuberculosis patients. *J Infect Dis* 168: 1056-1059, 1993.
- SENDIDE, K. *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG attenuates surface expression of mature Class II molecules through IL-10-dependent inhibition of Cathepsin S. *J Immunol* 175:5324-5332, 2005.
- SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2: 116-26, 2002.
- STERLING, T.R. *et al.* Immune Function in Young Children with Previous Pulmonary or Miliary/Meningeal Tuberculosis and Impact of BCG Vaccination. *Pediatrics* 120: e912-e921, 2007.
- TOOSI, Z.; ELLNER, J.J. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 163: 1162-1172, 1986.
- TORRES, M. *et al.* Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66: 176-180, 1998.
- WALLIS, R.S. *et al.* Granulomatous infectious disease associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis* 38: 1261-1265, 2004.
- WHO 2007a: www.who.int/lep/en/. Acessado em 17 de dezembro de 2007.
- WHO 2007b: <http://www.who.int/tb/en>. Acessado em 26/07/2007.