

Artigo original

Novos Aspectos da Patogenia da Tuberculose

The Pathogenesis of Tuberculosis: Novel Aspects

José R. Lapa e Silva¹

RESUMO

A tuberculose continua a assombrar a humanidade como uma das doenças infecciosas que mais incapacita e mata. Nosso objetivo foi rever a patogenia da tuberculose, um processo complexo, que envolve tanto o agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* como os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os novos instrumentos de biologia molecular permitiram grandes avanços na compreensão da epidemiologia da doença, assim como na identificação de possíveis alvos farmacológicos e de moléculas que podem ser usadas no diagnóstico das diversas fases da infecção.

Estudos da patogenia da tuberculose nos sítios ativos dos pulmões mostraram níveis significativamente mais elevados de mediadores que prejudicam a imunidade do tipo Th1 e inata, incluindo mediadores intracelulares e extracelulares. Esses e outros achados têm permitido aplicações no manejo da tuberculose. A proteína *early secretory antigenic target-6*, presente em micobactérias patogênicas e ausente no BCG, permitiu o desenvolvimento de testes diagnósticos úteis na identificação de infecção tuberculosa latente mesmo em vacinados com BCG.

Há uma correlação entre altos níveis de IL-10 ao final de tratamento antituberculose e recidiva da doença ao longo de avaliação, apontando um possívelnexo entre essa citocina anti-inflamatória e o risco de recaída por tuberculose.

Descritores: Tuberculose/genética; Tuberculosis/etiologia; Imunidade; Imunossupressão; Citocinas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) still looms as one of the most incapacitating and lethal infectious diseases worldwide. The objective of this article was to review the pathogenesis of tuberculosis, a complex process that involves the interaction between the etiologic agent *Mycobacterium tuberculosis* and host defense mechanisms. New molecular biology methods have allowed great advances in the understanding of tuberculosis epidemiology, as well as in the identification of possible pharmacologic targets and molecules that can be used in the diagnosis during the various stages of the infection.

Studies of the pathogenesis of tuberculosis at active disease sites in the lungs have demonstrated increased levels of mediators that impair Th1-mediated and innate immunity, including intracellular and extracellular mediators. Such findings have facilitated the application of new techniques in tuberculosis management. The discovery of early secretory antigenic target-6, which is present in pathogenic mycobacteria and absent from BCG, allowed the development of useful diagnostic tests for the identification of latent tuberculosis infection even in BCG-vaccinated individuals. There is a correlation between high IL-10 levels at the end of anti-tuberculosis treatment and tuberculosis recurrence, showing a possible link between this anti-inflammatory cytokine and the risk of tuberculosis recurrence.

Keywords: Tuberculosis/genetics; Tuberculosis/etiology; Immunity; Immunosuppression; Cytokines.

1. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.
Não há qualquer conflito de interesse entre os autores.

Endereço para correspondência: José R. Lapa e Silva. Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ. Avenida Prof. Rodolpho Paulo Rocco, 255, subsolo, Ilha do Fundão. CEP: 20541-913, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel. 55 21 2562-2669. E-mail: jrlapa.ntg@terra.com.br.

INTRODUÇÃO

O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* acompanha a humanidade há milhares de anos, tendo evoluído ao longo desse tempo e sofrido mutações devido às pressões de adaptação ao hospedeiro preferencial, o homem. Apresenta uma patogenia complexa, dependente da virulência da cepa responsável pela infecção e das respostas defensivas estabelecidas contra essa infecção, conforme proposto por Rich em 1943 (1):

$$P = NVH/(Rn + Ra)$$

onde P é a patogenicidade, N é o número de bacilos na carga infectante, V é a sua virulência, H é a hipersensibilidade do hospedeiro, Rn é sua resistência natural e Ra é sua resistência adquirida.

O balanço, portanto, entre as características do bacilo e a resposta protetora do organismo indicará o desfecho da infecção. Na realidade, nesses quase 70 anos desde a proposição dessa fórmula, o conhecimento científico avançou de forma significativa tanto no conhecimento das propriedades do *M. tuberculosis* como no entendimento dos mecanismos de defesa do organismo. É certo também que esse balanço delicado descrito na fórmula impede a erradicação completa do *M. tuberculosis* em um grande número de infectados, levando à tuberculose latente, que atinge cerca de um terço da humanidade. Desse enorme conjunto sairão os casos novos, e essa situação epidemiológica sombria permite-nos dizer que a tuberculose continuará sendo um grave problema de saúde pública ainda por muitas décadas.

Características Patogênicas da Micobactéria

Há mais de uma centena de espécies de micobactérias. No entanto, poucas são patogênicas para o homem. Entender, portanto, o que leva uma espécie a ser patogênica tem grande importância para a compreensão da tuberculose. O desenvolvimento nos últimos 20 anos das ferramentas de biologia molecular permitiu o sequenciamento integral de diversas espécies de micobactérias de patogenicidade diferentes, como *M. leprae* e o próprio *M. tuberculosis*. A comparação do genoma dessas duas espécies evidenciou que o *M. leprae* perdeu, ao longo da evolução, centenas de genes em comparação com o *M. tuberculosis*, já que possui um genoma com 3,27 milhões de pares de bases, contra 4,41 milhões do *M. tuberculosis* (2,3). Essa perda de genes resultou em uma patogenicidade diferenciada para o homem e em formas clínicas bastante diversas da tuberculose e da hanseníase. O caso do *M. bovis* também é ilustrativo desse ponto. Na década de 1910, os cientistas franceses Albert Calmette e Camille Guérin iniciaram experimentos em busca de uma vacina contra a tuberculose. Para isso, fizeram centenas de passagens de cepas de *M. bovis* em meio de cultura com bile até obterem uma cepa que se mostrou pouco

patogênica e capaz de proteger crianças contra formas graves da doença, que ficou conhecida com vacina BCG. Recentemente, o sequenciamento do genoma do BCG demonstrou que as sucessivas passagens levaram à perda de mais algumas centenas de genes, em regiões conhecidas como regiões de diferenciação, sendo a mais importante a região de diferenciação presente no *M. bovis* e ausente no BCG, diminuindo, assim, a patogenicidade da espécie consideravelmente, sem, contudo, impedir o desenvolvimento de uma robusta resposta imune, que também protege contra formas graves de tuberculose (4).

O sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* permitiu a realização de investigações sobre o papel de genes até então desconhecidos, através da genômica funcional. A identificação de genes presentes em cepas patogênicas de *M. tuberculosis*, como *H27Rv*, mas ausentes em cepas menos patogênicas, como o BCG, ou não patogênicas, como o *M. smegmatis*, permitiu a maior compreensão da patogenia da tuberculose, com aplicações inovadoras. É o caso da proteína *early secretory antigenic target-6* (ESAT-6), que apresenta atividade citolítica para pneumócitos, facilitando a invasividade do *M. tuberculosis* (5). Sua presença em micobactérias patogênicas e sua ausência no BCG permitiu o desenvolvimento de testes diagnósticos, como o QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (Cellestis Ltd., Melbourne, Austrália), que consiste em um teste de liberação de IFN- γ por linfócitos T de memória quando estimulados in vitro por ESAT-6 e *culture filtrate protein* (CFP)-10 (6). O teste é útil na identificação de infecção tuberculosa latente mesmo em vacinados com BCG. Outra aplicação é em vacinologia, com a inserção de sua sequência em vetores, como o próprio BCG, em busca de uma vacina mais robusta contra formas de tuberculose não influenciadas pelo BCG, como a tuberculose pulmonar (7). Presente apenas no complexo *M. tuberculosis*, a CFP-32 aumenta a secreção de IL-10 por células mononucleares. Há uma correlação positiva entre a presença de CFP-32 no escarro induzido em portadores de tuberculose e os níveis de IL-10, mas não em relação aos níveis de IFN- γ (8).

Mecanismos de Defesa do Hospedeiro Contra a Micobactéria

A tuberculose se transmite de pessoa a pessoa, sem vetores ou outros intermediários. A perpetuação da tuberculose se dá a partir do portador de tuberculose com doença pulmonar ativa (muitas vezes cavitária) para o contato sadio (normalmente alguém do seu convívio próximo) através da transmissão aérea por aerossol produzido por tosse, espirro ou fala, contendo nos núcleos sólidos ou nos núcleos de Wells uma ou duas micobactérias infectantes. No entanto, devido à sua permanente exposição aos potenciais insultos presentes no ar que respiramos, o aparelho respiratório desenvolveu, ao longo da evolução, mecanismos

inespecíficos de contenção, como a depuração mucociliar. Esses mecanismos permitem que grande parte dos bacilos aspirados seja contida na porta de entrada. Adicionalmente, os poucos bacilos que escapam dessa barreira física de contenção enfrentam os mecanismos alveolares, sendo a fagocitose pelos macrófagos alveolares o mais importante. Se lograrem escapar desses poderosos mecanismos, os bacilos entram em multiplicação, constituindo o cancro de inoculação ou complexo de Gohn, a partir do qual se faz a disseminação linfática e a inflamação do gânglio regional, constituindo o chamado complexo primário. A partir da disseminação por via sanguínea, bacilos se instalam em outros órgãos até o surgimento, de duas a três semanas após o evento inicial, da imunidade adquirida ou adaptativa, na qual a resposta de defesa é especificamente dirigida contra componentes do agente agressor, no caso, o *M. tuberculosis*.

A cooperação entre macrófagos e linfócitos T funciona como um elemento chave na defesa contra a infecção por *M. tuberculosis* (9). Nada exemplifica melhor isso que a enorme suscetibilidade de portadores da infecção pelo HIV à tuberculose, devido à disfunção das células T, particularmente CD4+. Os macrófagos e as células dendríticas fagocitam o *M. tuberculosis* e, depois de destruir e processar seus componentes, apresentam aos linfócitos seus principais antígenos no contexto de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade tipos I e II. Essas células ainda usam, para a apresentação antigênica, importantes moléculas de superfície, chamadas moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86 (10). A apresentação antigênica precipita uma cascata de eventos biológicos nos linfócitos, como a ativação, a expansão clonal e a secreção de importantes citocinas (por exemplo, IFN- γ) que, por sua vez, vão ativar outros macrófagos, permitindo que eles sejam mais eficazes na eliminação do *M. tuberculosis*. Entretanto, os macrófagos têm também uma função menos nobre: a de abrigar os bacilos e de permitir sua multiplicação intracelular, protegendo-os dos mecanismos externos de eliminação e levando o indivíduo ao estado de tuberculose latente ou ao de tuberculose ativa progressiva. Os macrófagos utilizam diversos mecanismos para tentar eliminar o *M. tuberculosis* de seu interior, como a apoptose ou morte programada, que permitirá sua eliminação para o meio extracelular, assim como a fagocitose por outros macrófagos mais ativados. Esses lançam mão de um aumento da expressão de enzimas, como a inducível nitric oxide synthase (iNOS), que secreta o radical livre óxido nítrico, altamente tóxico para o *M. tuberculosis* (11).

Os linfócitos T CD4+ e CD8+ desempenham um papel fundamental na imunidade protetora contra o *M. tuberculosis*. As células T CD4+ auxiliares secretam citocinas essenciais para a eliminação do *M. tuberculosis*, enquanto as células T CD8+ citotóxicas têm um efeito citolítico direto contra o *M. tuberculosis*, através

de grânulos citotóxicos contendo perforina que, juntamente com a granzima, produzem poros na membrana celular, além de também secretarem citocinas. As células T CD4+ são divididas em vários tipos, de acordo com o padrão de citocinas que secretam. As células Th1 secretam IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α , TNF- β e IFN- γ . As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, que induzem a diferenciação de linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral, além de regular negativamente a resposta Th1 (9). As células Th17 produzem IL-17 e IL-23 e estão envolvidas na regulação da resposta imune, cujo papel na tuberculose ainda está em investigação (12).

Outra citocina fundamental tanto na proteção quanto na patogenicidade da tuberculose é o TNF- α , secretado por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos ativados. Essa citocina é essencial na formação do granuloma, local onde as ações biológicas da tuberculose se produzem. Um dos achados mais contundentes da infecção pelo HIV é a incapacidade do organismo em formar granulomas completos, com a consequente presença de necrose caseosa mais volumosa e um grande número de bacilos dispersos em seu interior, contribuindo para a disseminação da doença. Sua inativação, através do uso consagrado de antagonistas do TNF- α , levou a um aumento considerável do risco de reativação da tuberculose latente. Por outro lado, a citocina tem um efeito pró-inflamatório muito intenso, contribuindo para as alterações sistêmicas vistas na tuberculose, e a frequência aumentada de linfócitos T CD4+ secretores de TNF- α é um preditor forte de desenvolvimento de doença ativa (13).

INTERAÇÃO MICOBACTÉRIA-HOSPEDEIRO

Há evidências de que mecanismos de defesa contra as micobactérias sejam afetados durante o desenvolvimento da tuberculose ativa, um fenômeno induzido pela micobactéria em si e que funcionaria como um mecanismo de escape (14). O desequilíbrio na produção de citocinas responsáveis pela ativação e desativação de macrófagos pode ser um dos mecanismos possíveis para esse fenômeno. Lisados de células obtidas por LBA de pulmões afetados por tuberculose mostram uma expressão de mRNA de citocinas que acionam a ativação de macrófagos (IL-2 e IFN- γ). No mesmo local, foi visto ocorrer a expressão de outras citocinas (IL-4 e IL-10) que poderiam agir como desativadoras das funções bactericidas de macrófagos (15). Nos mesmos lisados, foi verificada a expressão dos receptores tipo I (RI) e tipo II (RII) para TGF- β , que poderia tornar os macrófagos sensíveis à ação desativadora do ligante. Além disso, no sobrenadante do LBA, havia uma grande quantidade do ligante funcionalmente ativo desses receptores. A presença de IL-10 no sítio da infecção pelo *M. tuberculosis* parece facilitar a evolução para a doença ativa, provavelmente pela supressão dos mecanismos protetores contra a tuberculose (16). Em outro estudo, os níveis de expressão de genes com atividade imune mediadora no momento

do diagnóstico e durante o tratamento antituberculose foram quantificados em material pulmonar de portadores de tuberculose (17). Casos de tuberculose pulmonar ativa apresentaram níveis significativamente mais elevados de mediadores que prejudicam a imunidade do tipo Th1 e inata, incluindo mediadores intracelulares, como *suppressor of cytokine signaling* (SOCS1) e *interleukin-1 receptor-associated kinase M* (IRAK-M), e extracelulares (IL-10, TGF- β RII, IL-1RN e indoleamine 2,3-dioxygenase). Esses moduladores são uma resposta direta ao *M. tuberculosis*, já que, após 30 dias de tratamento antituberculose, muitos fatores com atividade supressora declinaram para os níveis exibidos pelos controles sem tuberculose, enquanto a maioria dos mediadores Th1 e de imunidade inata subiram acima dos níveis exibidos antes do tratamento (17). A consequência da expressão elevada de SOCS1, IRAK-M e *toll-like receptor 2* (TLR2), assim como de potentes supressores solúveis da ativação dos macrófagos, como IL-10 e TGF- β , pode resultar em menor atividade microbicida, como se deduz pela presença de menos de 30% de macrófagos das áreas de lesão que expressaram a enzima iNOS, envolvida no mecanismo de destruição de micobactérias em modelos mu-

ros (18). Lago et al. estabeleceram uma correlação entre altos níveis de IL-10 ao final de tratamento antituberculose e recidiva da doença ao longo de avaliação, apontando um possível nexos entre esta citocina anti-inflamatória e o risco de recaída por tuberculose (19).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A patogenia da tuberculose é um processo complexo que envolve tanto o agente etiológico como os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os novos instrumentos de biologia molecular permitiram grandes avanços na compreensão da epidemiologia da doença, na identificação de possíveis alvos farmacológicos e de moléculas que podem ser usadas no diagnóstico das diversas fases da infecção, assim como no entendimento dos mecanismos imunitários básicos e como o *M. tuberculosis* os manipula a seu favor no estabelecimento e manutenção da infecção e da doença. Em um recente documento da Organização Mundial da Saúde, destaca-se a necessidade de mais pesquisas relacionadas à patogenia da tuberculose para permitir maiores avanços no controle da enfermidade (20).

REFERÊNCIAS

1. Rich AR. The Pathogenesis of Tuberculosis. 1st Edition. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, IL, USA, 1944, 1008 p.
2. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409(6823):1007-11.
3. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393(6685):537-44.
4. Garcia Pelayo MC, Uplekar S, Keniry A, Mendoza Lopez P, Garnier T, Nunez Garcia J et al. A comprehensive survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across Mycobacterium bovis strains and M. bovis BCG vaccine strains refines the genealogy and defines a minimal set of SNPs that separate virulent M. bovis strains and M. bovis BCG strains. *Infect Immun* 2009; 77(5):2230-8.
5. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12420-5.
6. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun* 2000;68(6):3314-21.
7. Deng Y, Bao L, Yang X. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis infection elicited by recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing human Interleukin-12p70 and Early Secretory Antigen Target-6 fusion protein. *Microbiol Immunol*. 2011 Aug 10. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00376.x.
8. Huard RC, Chitale S, Leung M, Lazzarini LCO, Zhu H, Shashkima E et al. The Mycobacterium tuberculosis complex-restricted gene *cpf32* (Rv0577) encodes an expressed protein that is detectable in human tuberculosis patients. *Infect Immun* 2003; 71:6871-6883.
9. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
10. Flores-Batista VC, Boechat N, Lago PM, Lazzarini LC, Pessanha LR, Almeida AS et al. Expression of costimulatory and dendritic cell molecules on lung cells from patients with active tuberculosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007, 40:1671-1679.
11. Nicholson S, Bonecini-Almeida MG, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996; 183:2293-2302
12. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(6):455-62.
13. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP et al. Dominant TNF- α Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med* 2011;17(3):372-6.
14. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S et al. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 1999;180(6):2069-73.
15. Bonecini Almeida MG, Ho JL, Boéchat N, Huard RC, Chitale S, Doo H et al. Down-Modulation of Lung Immune Responses by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β (TGF- β) and Analysis of TGF- β Receptors I and II in Active Tuberculosis. *Infect Immun* 2004; 72:2628-2634.
16. Lapa e Silva JR, Almeida AS, Boechat N, Flores-Batista VL, Lago PM, Lazzarini LC et al. Immunosuppressive state in the lung response to Mycobacterium tuberculosis. In: Tomioka H, ed. *Current Topics on the Profiles of Host Immunological Response to Mycobacterium tuberculosis*. Research Signpost, Kerala, India, 2009, pp.

- 167-182.
17. Almeida AS, Lago PM, Boechat N, Huard R C, Lazzarini LC, Santos AR et al. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. *J Immunol* 2009; 183:718-731.
 18. Ho JL, Lapa e Silva JR. Promotion of a down-modulated lung immune state may be a strategy by *M. tuberculosis* to foster active disease and persistence. *Discov Med* 2010;9:34-41.
 19. Lago PM, Boéchat N, Migueis DP, Almeida AS, Lazzarini C, Saldanha MM, Kritski AL, Ho JL, Lapa e Silva. Interleukin-10 and interferon-gamma patterns during tuberculosis treatment: possible relationship with recurrence [Short communication]. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012, 16(5):656-659.
 20. World Health Organization. An international roadmap for tuberculosis research: towards a world free of tuberculosis. Geneva: WHO Press, 2011, 80 pp.