



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso

JACQUELINE GONÇALVES REHM

Vacinas para a prevenção da Tuberculose: a luta contra a Peste Branca

Porto Alegre
2010



JACQUELINE GONÇALVES REHM

Vacinas para a prevenção da Tuberculose: a luta contra a Peste Branca

Trabalho de conclusão do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizado durante o 2º semestre de 2010 e apresentado como requisito parcial para obtenção do Título Profissional Farmacêutico.

Orientador: Dr. Amauri Braga Simonetti
Co-orientador(a): MSc. Diana Carolina Rostirolla

Porto Alegre
2010

JACQUELINE GONÇALVES REHM

Vacinas para a prevenção da Tuberculose:
a luta contra a Peste Branca

Banca examinadora:

Dr. José Carlos Germani

MSc. Valnês da Silva Rodrigues Junior

Porto Alegre
2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Antônio Rehm e Marly Terezinha Mentz Gonçalves, por todo amor e incentivo. Agradeço também por sempre me proporcionarem estudo de qualidade e por me fazerem crer que sou capaz, sem eles nada disso seria possível.

Ao meu orientador, o professor Amauri Braga Simonetti, por ter sido um ótimo professor, por toda a ajuda e ensinamentos.

À minha amiga e co-orientadora Diana Rostirolla, que sempre esteve disposta a me ajudar em todos os momentos, agradeço por toda a ajuda, sugestões e ensinamentos. Agradeço também pela amizade e pelas risadas proporcionadas sobre o mundo fantástico da magia.

Ao Prof. Diógenes Santiago Santos, agradeço pela oportunidade de trabalhar durante toda a minha graduação junto ao seu grupo de pesquisa e por me apresentar à tuberculose, doença que eu julgava não existir mais. Agradeço também por me apresentar o que é ciência e pesquisa de verdade.

Aos meus irmãos Fernanda Gonçalves Rehm e José Antônio Rehm Júnior, e também a minha tia Nilma, agradeço pelos momentos de convívio e por todo amor e amizade.

Ao meu namorado, amigo e colega Paulo Weckerle Neto, por todo o amor e companheirismo ao longo desses anos, sem os quais não teriam o mesmo sentido.

Às minhas amigas, Tamara, Géssica, Fernanda e Mel, por toda alegria e companheirismo ao longo de quase uma vida inteira de amizade. Também agradeço “as chuchas” que apareceram mais tarde na minha vida, Adriana e Tathyana, bem como ao meu amigo Guilherme pelos mesmos motivos.

Aos meus colegas de curso que serão inesquecíveis na minha vida, agradeço por todos os momentos de amizade, estudos e descontração.

A bibliotecária Heloísa Canabarro, pela disponibilidade em me ajudar.

Por último, e com certeza não menos importante, agradeço pelos momentos maravilhosos de amizade, ensinamentos e descontração aos meus ex-colegas do CPBMF e Quato-G: Zilpa Adriana, Tathyana Mar, Ana Paula, Anne, Cândida, Christiano, Cristopher, Carol, Claudinha, Dai, Daniel, Eraldo, Fábio, Gaby, Giandra, Gisele, Gleci, Greg, Gustavo, Jocelei, Jordana, Juleane, Júnior, Kati, Lala, Léia, Leo Rosado, Leo Martinelli, Luis, Natasha, Natália, Pâmela, Priscila, Rafael, Renilda, Rodrigo, Tina, Thiago, Zé.

Nowhere in these ancient communities of the Eurasian land mass, where it is so common and feared, is there a record of its beginning. Throughout history, it had always been there, a familiar evil, yet forever changing, formless, unknowable. Where other epidemics might last weeks or months, where even the bubonic plague would be marked forever afterwards by the year it reigned, the epidemics of tuberculosis would last whole centuries and even multiples of centuries. Tuberculosis rose slowly, silently, seeping into homes of millions, like an ageless miasma. And once arrived, it never went away again. Year after year, century after century, it tightened its relentless hold, worsening whenever war or famine reduced the peoples' resistance, infecting virtually everybody, inexplicably sparing some while destroying others, bringing the young down onto their sickbeds, where the flesh slowly fell from their bones and they were consumed in the yearslong fever, their minds brilliantly alert until, in apocalyptic numbers, they died, like the fallen leaves of a dreadful and premature autumn"

The Forgotten Plague:
How the War against Tuberculosis was Won - and Lost
Frank Ryan, 1992.

There is a dread disease which so prepares its victim, as it were, for death; which so refines it of its grosser aspect, and throws around familiar looks unearthly indications of the coming change; a dread disease, in which the struggle between soul and body is so gradual, quiet, and solemn, and the result so sure, that day by day, and grain by grain, the mortal part wastes and withers away, so that the spirit grows light and sanguine with its lightening load, and, feeling immortality at hand, deems it but a new term of mortal life; a disease in which death and life are so strangely blended, that death takes the glow and hue of life, and life the gaunt and grisly form of death; a disease which medicine never cured, wealth never warded off, or poverty could boast exemption from; which sometimes moves in giant strides, and sometimes at a tardy sluggish pace, but, slow or quick, is ever sure and certain"

Nicholas Nickleby
Charles Dickens, 1870.

RESUMO

Aproximadamente dois milhões de pessoas morrem de tuberculose (TB) por ano, o que representa uma morte a cada 18 segundos. Estimativas sugerem que um terço da população mundial está infectado com o *M. tuberculosis*, agente etiológico da TB que sozinho é responsável por mais mortes do que qualquer outro agente patogênico. A co-infecção com o HIV e a emergência de TB resistente a múltiplas drogas representam um desafio à saúde pública. Embora a vacinação por BCG seja uma estratégia profilática eficaz e segura para prevenir formas severas da doença em crianças, a eficácia da mesma é insuficiente para a proteção contra a forma pulmonar em adolescentes e adultos, que correspondem à população mais acometida pela doença. Deste modo, existe uma urgente necessidade de novas estratégias profiláticas, que utilizem novas abordagens de vacinação, como a substituição da BCG e/ou o seu reforço. Dentre as principais estratégias de vacinação que têm sido estudadas, consta a vacinação administrada antes da exposição ao patógeno (pré-exposição) ou depois (pós-exposição). Diferentes populações necessitam ser vacinadas, que correspondem àqueles já vacinados com a BCG na infância e àqueles infectados com *M. tuberculosis* e/ou com HIV, desse modo, necessitando de atenção especial. A presente revisão apresenta alguns aspectos gerais sobre a TB e seus agentes etiológicos, tipos de imunidade gerados por esta doença e os principais candidatos a vacinas contra a TB que estão atualmente em ensaios clínicos. Para tanto, os mesmos foram divididos em duas categorias principais de acordo com os regimes de pré e pós-exposição.

Palavras-chave: tuberculose; vacinas; *M. tuberculosis*; BCG; imunidade.

ABSTRACT

Every year almost 2 million people have died from tuberculosis (TB), equaling one death every 18 seconds. Estimatives suggest that one third of the world population is infected with *M. tuberculosis*, the etiological agent which is responsible for more deaths than any other single infectious organism. Co-infection with HIV and the emergence of multidrug-resistant TB is a threat to public health. Although vaccination with BCG is an effective and safe prophylactic strategy to prevent severe forms of the disease in children, it's effectiveness is not sufficient to protect against pulmonary TB in adolescents and adults, the most affected population. Thus, there is an urgent need for new prophylactic strategies, using new approaches to out of vaccination, as the replacement of the BCG and / or its reinforcement. Among the main vaccination strategies that have been studied, are the vaccination given before (pre-exposure) or after (post-exposure) exposure to the pathogen. Different populations need to be vaccinated, which include those who had already been vaccinated with BCG in infancy and those infected with *M. tuberculosis* and / or HIV infection, thus requiring special attention. This review presents some general aspects of TB and their etiologic agents, types of immunity generated by this pathogen and the leading candidate vaccines against TB that are currently in clinical trials. To do so, they were divided into two So we have presented this work divided into main categories according to the schemes of pre-and post-exposure.

Keywords: tuberculosis; vaccines; *M. tuberculosis*, BCG; immunity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Tuberculose.....	11
1.1.1 BCG.....	15
1.2 Tuberculose no Brasil.....	16
2 PATOGENIA, INFECÇÃO E SISTEMA IMUNE	18
2.1 O gênero <i>Mycobacterium</i>	18
2.2 Infecção por <i>M. tuberculosis</i>	18
2.3 Resposta imune inata e adaptativa	20
2.3.1 Resposta Imune Inata	20
2.3.1.1 Macrófagos.....	20
2.3.1.2 Células Dendríticas	21
2.3.1.3 Neutrófilos	21
2.3.1.4 Mastócitos	22
2.3.1.5 Células Natural Killer.....	22
2.3.2 Resposta Imune Adaptativa	23
2.3.2.1 Resposta imune humoral e celular	23
3 ANTÍGENOS E ADJUVANTES NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS	25
3.1 Antígenos do <i>M. tuberculosis</i>	25
3.2 Adjuvantes nas vacinas contra TB	26
4 VACINAS	28
4.1 Vacinas pré-exposição (substituintes da BCG)	31
4.1.1 rBCG	31
4.2 Vacinas pós-exposição (vacinas de reforço).....	33
4.2.1 Vetores virais.....	35
4.2.2 Proteínas recombinantes.....	36
4.2.3 Micobactéria e/ou fragmentos inativados	37
4.3 Vacinas com Ácidos Nucléicos.....	38
5 CUSTOS E FUNDOS	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41

Este trabalho segue as regras da Associação Brasileira de Normas Técnicas para elaboração de trabalho de conclusão de curso na forma de monografia (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002; 2005).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa que acompanha a história da humanidade desde os tempos mais remotos. Seu principal agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*, é apontado como o responsável por causar mais mortes em humanos do que qualquer outro patógeno (Daniel, 2006).

Acredita-se que esta doença esteve presente nos humanos há milhares de anos, mas a primeira referência à natureza infecciosa da TB foi relatada apenas no século XVII, na literatura italiana. Devido aos seus diferentes sintomas, a TB não era identificada como uma doença única até o ano de 1820, sendo denominada de TB somente em 1839, por JL Schonlein (Cole, 2005).

Existem relatos da doença de até 5.000 anos atrás, em países como Egito, Índia e China sendo que as primeiras lesões típicas da TB foram encontradas em múmias egípcias e andinas, onde a etiologia foi confirmada a partir da presença de material genético de *M. tuberculosis* nos tecidos dessas múmias. A doença existiu também na América antes de Colombo e em Bornéu, antes de qualquer contato com o povo europeu (Daniel, 2006).

Conhecida como a “grande peste branca”, devido à palidez facial das pessoas infectadas, a epidemia de TB na Europa iniciou no século XVII e estendeu-se por 200 anos. A morte por TB era considerada inevitável e, por todo esse período, foi a principal causa de óbitos na população. A partir de então, a epidemia se espalhou lentamente para os outros continentes devido à exploração e colonização pelos indivíduos infectados (Palomino, 2007).

Embora já se tivesse um escasso conhecimento sobre a enfermidade, foi somente no final do século XIX que o mundo conheceu o agente etiológico da TB, quando o médico e pesquisador alemão Robert Koch demonstrou pela primeira vez que essa doença é causada pelo *M. tuberculosis*, ou “bacilo de Koch”, como ficou popularmente conhecido. Esta descoberta, que anos mais tarde lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina (1905), foi o marco fundamental para um melhor entendimento da doença.

A TB humana é uma doença potencialmente fatal e seu modo de transmissão, que ocorre pelo ar, contribui para sua rápida expansão. O bacilo da TB pode permanecer por anos no organismo do hospedeiro sem manifestação da doença (TB latente), no entanto, indivíduos imunocomprometidos apresentam maior chance de desenvolver a doença ativa. Nos países desenvolvidos, idosos, minorias étnicas e imigrantes estrangeiros são os mais atingidos pela TB. Enquanto isso, nos países em desenvolvimento, o predomínio de indivíduos que possuem TB ativa está na população economicamente ativa (de 15 a 54 anos), e as pessoas mais pobres, menos escolarizadas, privadas de liberdade (detentos) e em situação de rua (moradores de rua) correspondem à maioria dos casos. Além disso, os homens adoecem duas vezes mais do que as mulheres (Brasil, 2010).

A forma de infecção mais comum da doença ocorre por inalação de aerossóis de 1 a 3 µm contendo o microrganismo, que são expelidos pela pessoa infectada ao tossir ou espirrar. Estas partículas infectadas podem permanecer em suspensão no ar por horas e a presença de apenas um bacilo já é suficiente para causar a infecção. A tosse seca com escarros é característica principal do paciente tuberculoso, que também apresenta sintomas como sudorese noturna, fraqueza, perda de peso, dores no peito e dificuldades respiratórias (Ducati, 2006).

O atual tratamento padrão da TB, preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tem a duração de seis meses, sendo composto por dois meses de tratamento com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol seguido por quatro meses com isoniazida e rifampicina. O propósito desta terapia combinada é evitar o surgimento de resistência por parte do microrganismo infectante, entretanto, em casos de inadimplências e descontinuidade do tratamento, a doença pode evoluir e o microrganismo adquirir resistência a essas drogas (WHO, 2010e).

Infectando cerca de um terço da população mundial e resultando em uma mortalidade anual de 2 milhões de pessoas, o *M. tuberculosis* é uma ameaça à saúde global (**Figura 1**). Enquanto a maioria destas infecções permanece latente (assintomática e não contagiosa), 5 a 10% das pessoas infectadas podem desenvolver a doença ativa e contagiosa, resultando em debilidade ou morte (WHO, 2010c). Dados epidemiológicos mostram a evolução crescente dos casos de TB em todo o mundo e caso o controle da doença não seja reforçado, estima-se que de 2010 a 2020, mais de um bilhão de pessoas será infectado e cerca de 200 milhões desenvolverão TB ativa, enquanto 35 milhões evoluirão a óbito (WHO, 2010d).

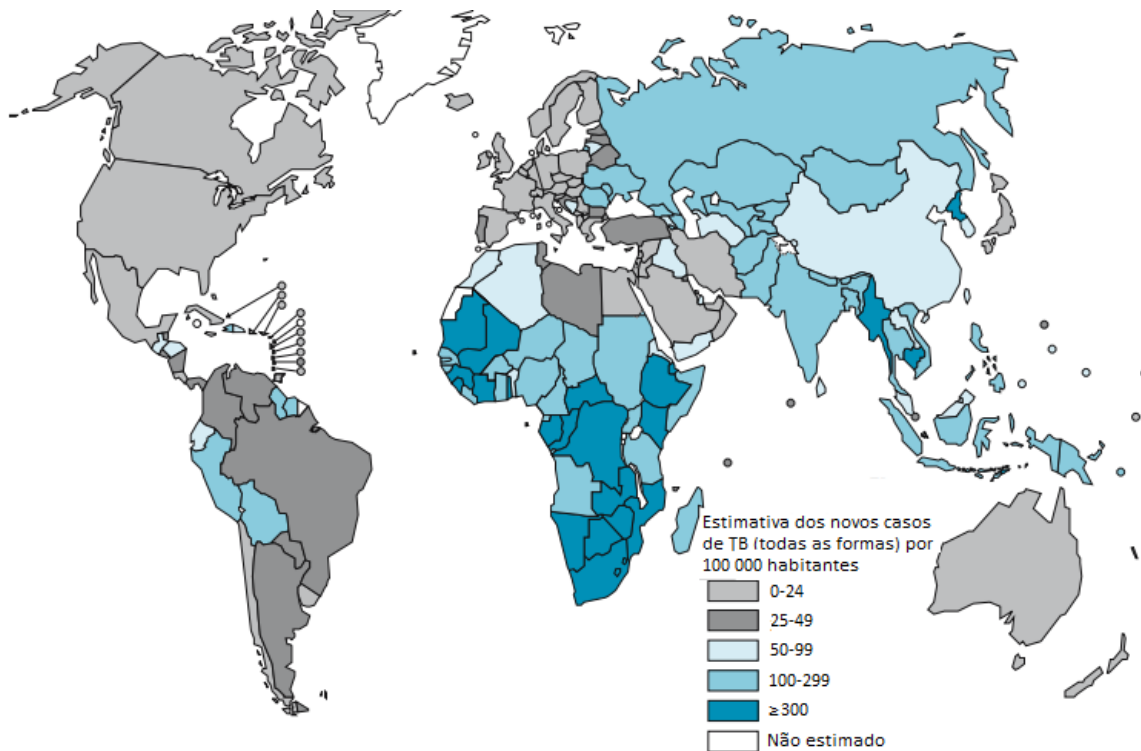


Figura 1. Estimativa da incidência de TB por país, 2009. Fonte: Adaptado de WHO, 2010b.

Com a descoberta da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA / AIDS), em 1981, observou-se, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, um crescente número de casos notificados de TB em pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A associação dessas duas enfermidades constitui um sério problema de saúde pública, levando ao aumento da morbidade e da mortalidade pela TB em muitos países (Brasil, 2010). Atualmente, a TB é considerada a principal causa de morte em indivíduos HIV positivos, sendo a co-infecção TB/HIV responsável por 15% dos 9,4 milhões de casos de TB incidentes em 2008 (WHO, 2010c).

“Não podemos lutar contra a AIDS, a menos que façamos muito mais para combater a TB” (Nelson Mandela, XV Conferência Internacional de AIDS-Bangkok 2004).

Uma potencial ameaça ao controle da TB é a emergência de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes, que não podem ser combatidas empregando-se as terapias padrão anti-TB. A multirresistência é um fenômeno biológico considerado

iatrogênico, fruto de tratamentos inadequados, uso irregular de medicamentos ou pela utilização de esquemas terapêuticos de baixa potência. A TB multirresistente (TB-MDR), causada pela bactéria resistente à, pelo menos, isoniazida e rifampicina, corresponde a 3,5% do total de casos de TB (50% destes casos ocorrem na China e Índia). A cada ano, 424.000 indivíduos desenvolvem TB-MDR e acredita-se que o principal fator de surgimento desses casos seja a má administração dos medicamentos anti-TB, aliado à descontinuidade do tratamento por parte do paciente (WHO, 2010a; 2010e). Esta forma da doença pode surgir a partir da transmissão de uma pessoa infectada para outra e, quando não tratada, pode evoluir para formas mais severas tais como TB extensivamente resistente (TB-XDR). Casos de TB-XDR, definidos como resistentes à isoniazida e rifampicina, a qualquer fluoroquinolona e qualquer droga de segunda-linha injetável (canamicina, capreomicina, amicacina), não respondem ao tratamento padrão de seis meses e requerem dois anos ou mais de tratamento empregando-se drogas menos potentes, mais tóxicas e muito mais caras (WHO, 2010e).

Enquanto a TB-MDR e XDR significam uma ameaça à saúde pública e ao controle da TB no mundo, possíveis casos de TB totalmente resistentes às drogas (TB-TDR) aumentam a preocupação quanto a uma futura epidemia de TB incurável (Velayati, 2009). Diante de tal cenário, há uma urgente necessidade de desenvolvimento de novas drogas anti-TB e também de pesquisa por novas estratégias profiláticas. Um exemplo dos esforços para combater a TB é o plano de eliminação da TB em nível mundial para o período de 2006 a 2015, implementado pela OMS, que vem realizando diferentes investimentos em pesquisas e programas de controle que permitam atingir estes objetivos.

Nesse contexto, e em termos de eficiência e custo, a estratégia mais utilizada de intervenção contra qualquer doença infecciosa é a vacinação (Ly, 2008). Em geral, as vacinas têm ajudado a reduzir a mortalidade infantil em 30% desde o ano de 1990 e anualmente evitam a morte de 2,5 milhões de crianças (BIO Ventures for Global Health, 2006).

A vacina utilizada para a prevenção da TB corresponde ao bacilo de Calmette-Guérin (BCG), uma das vacinas mais utilizadas no mundo. Embora seja efetiva na prevenção de formas severas da doença em neonatos, como a TB miliar e meníngea, a eficácia da BCG é insuficiente para a proteção contra a forma pulmonar em adolescentes e adultos (Parida, 2010). Mais de 60% de todos os casos de TB

ocorrem na fase mais produtiva da vida de uma pessoa, que é a faixa etária de 25 a 54 anos de idade, gerando um grande problema econômico em termos de custo de tratamento e também, a diminuição na produtividade (BIO Ventures for Global Health, 2006). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de imunização global contra essa doença, como medida de redução dos níveis epidemiológicos, que seja capaz de prevenir a infecção de adultos, e de combater o microrganismo em fase de latência no hospedeiro, evitando a sua reativação.

Nos últimos anos, resultados promissores de novas vacinas para prevenir a TB têm sido obtidos, sendo que alguns candidatos a estas vacinas já se encontram em estudos clínicos de fase I e II. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo a revisão dos principais candidatos à vacina preventiva contra TB e, também, aqueles promissores a reforçar a resposta imune do indivíduo já exposto ao bacilo e/ou previamente vacinado com a BCG.

1.1.1 **BCG**

A vacina utilizando BCG foi desenvolvida no início do século XX a partir de 230 sucessivas atenuações de uma cepa patogênica de *M. bovis*, realizadas por Albert Calmette e Camille Guérin (Palomino, 2007). A vacinação por BCG faz parte do Programa Expandido de Imunização desde 1974, cobrindo desde então mais de 80% dos lactentes, com aproximadamente 4 bilhões de indivíduos já imunizados. A vacina requer uma única dose, geralmente isenta de complicações graves, podendo inclusive ser administrada pela via oral. Todavia, a via de inoculação mais utilizada é a via intradérmica (Ducati, 2006).

A BCG corresponde à estratégia profilática mais eficiente e segura para prevenir formas severas de TB em crianças, com custo de produção relativamente baixo. No entanto, a BCG tem falhado na prevenção da doença em adolescentes e adultos. Devido à ausência de alternativas de imunização que substituam e/ou aumentem a proteção da BCG, seu uso prossegue em muitos países, na grande maioria nos países em desenvolvimento. Em um total de 67 países, a vacinação por BCG é obrigatória no nascimento, e aproximadamente 167 países a utilizam. Os Estados Unidos, Canadá e alguns países da Europa são exemplo de países que não fazem o uso da BCG (Kaufmann, 2010b; Palomino, 2007; Parida, 2010).

O nível de proteção conferido pela BCG é muito variável, e sofre influência de acordo com características particulares dos indivíduos, tais como: genética, nutrição, estado de saúde (coexistência de outra infecção, como por exemplo, HIV), e, inclusive a naturalidade. Outro fator relevante no que diz respeito à eficácia da vacina é que, atualmente, existem variantes do BCG utilizados como vacina pelo mundo (como *BCG Moscou*, *BCG Moreau* e *BCG Pasteur*), sendo que estes são diferentes uns dos outros e também diferentes da linhagem ancestral. Estes variantes apresentam diferentes lesões genéticas (incluindo deleções e inserções) que, conseqüentemente, modificam as suas propriedades imunológicas e resultam em níveis variados de virulência residual. O BCG Moreau RDJ, variante da BCG desenvolvida e produzida no Brasil, é considerado o mais imunogênico dos variantes, e é muito semelhante ao BCG Pasteur original (Antas, 2008; Palomino, 2007).

1.2 Tuberculose no Brasil

De acordo com o Ministério da Saúde, estima-se que cerca de 57 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *M. tuberculosis* no Brasil. Anualmente, são notificados aproximadamente 72 mil casos novos e 4,7 mil mortes em decorrência desta doença. No âmbito mundial, o Brasil está entre os 22 países que abrangem 80% dos casos mundiais de TB e, atualmente, ocupa a 19ª posição em número total de casos, já tendo ocupado a 14ª em 2004 (Brasil, 2010). As maiores taxas de incidência da doença estão nos estados do Rio de Janeiro (71,8 por 100 mil habitantes), Amazonas (67,8), Pará (48,0) e Rio Grande do Sul (46,9) (**Figura 2**) (Brasil, 2010).

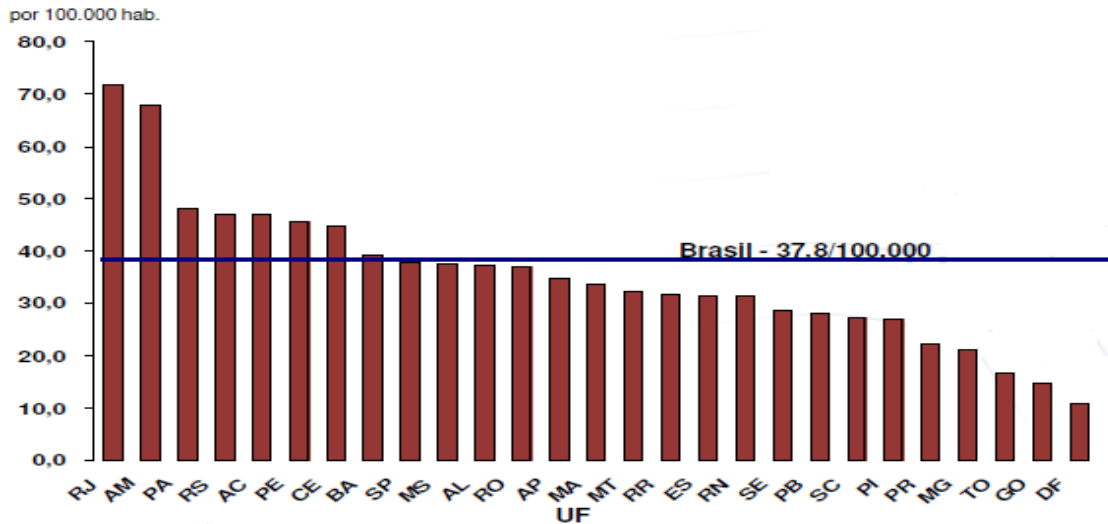


Figura 2. Incidência de TB por UF. Brasil 2009. Fonte: Brasil, 2010.

Além disso, no país, são relatados aproximadamente 400 novos casos de TB-MDR a cada ano, sendo que cerca de 75% correspondem à resistência adquirida e 25% por contato primário ao patógeno já resistente (Brasil, 2010). Entende-se por resistência adquirida as mudanças ocorridas em um microrganismo que afetam sua sensibilidade aos antimicrobianos, e que de sensível passa a ser resistente.

O esquema de tratamento da doença segue os modelos preconizados pela OMS e a vacina preventiva BCG, que faz parte do calendário de vacinação da criança, é ministrada aos recém-nascidos na forma de dose única pela via intradérmica. Essas medidas para o controle da doença geram um orçamento nacional de U\$ 69 milhões e, desde 2002, o percentual de cura tem aumentado gradativamente, tendo alcançado o índice de 73% em 2008. No entanto, a meta do Programa Nacional de Controle da TB é atingir a taxa de 85%, recomendada pela OMS (Brasil, 2010).

2 PATOGENIA, INFECÇÃO E SISTEMA IMUNE

2.1 O gênero *Mycobacterium*

Atualmente, são conhecidas 60 espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, sendo a maioria representada por bactérias saprófitas do solo e uma minoria por bactérias patogênicas aos seres humanos. Embora o *M. tuberculosis* seja o principal agente etiológico da TB, outros membros do gênero *Mycobacterium* também podem causar a doença, como o *M. africanum* e *M. ulcerans*, que são patógenos primários, e o *M. bovis*, que geralmente infecta animais, mas também é patogênico para humanos (Ducati, 2006). As bactérias desse gênero são assim classificadas devido à presença de ácidos micólicos na parede celular, que são cadeias longas de ácidos graxos que conferem ao microrganismo maior resistência a danos e ação de antibióticos.

As micobactérias são apontadas como as bactérias mais preservadas devido à resistência conferida pela parede celular rica em lipídeos e também pela alta proporção de guanina e citosina em seu DNA, o que aumenta a sua estabilidade (Palomino, 2007).

2.2 Infecção por *M. tuberculosis*

O *M. tuberculosis* é uma bactéria aeróbia gram-positiva não formadora de esporos e toxinas, que se apresenta na forma de bastonetes delgados não flagelados. Possui cerca de 4000 genes, que são expressos de modo diferente de acordo com as mais variadas condições de crescimento. Sua reprodução é considerada lenta (divisão celular em torno de 24 horas tanto *in vivo* quanto *in vitro*) e o bacilo possui um complexo envelope celular. O *M. tuberculosis* infecta preferencialmente macrófagos do sistema pulmonar, onde é contido pelo sistema imune e, na maioria das vezes, condicionado a um estado de dormência (Ducati, 2006; Palomino, 2007).

O bacilo da TB normalmente penetra no organismo do hospedeiro através da inalação de partículas contaminadas que são expelidas por indivíduos infectados e, entre os indivíduos expostos, somente 20 a 50% tornam-se infectados (Skeiky, 2006).

Durante a infecção pulmonar, o microrganismo é fagocitado pelos macrófagos alveolares e, mesmo no fagossomo, é capaz de evitar sua eliminação e se proteger contra outras células do sistema imune. Embora não muito compreendido, acredita-se que para tanto o bacilo empregue diferentes mecanismos, que incluem: mudança do pH, inibição da apoptose e destruição de compostos tóxicos. Esses mecanismos permitem ao bacilo crescer e persistir no fagossomo, pois caso contrário, não sobreviveria no ambiente hostil criado pós-fagocitose (Doherty, 2005; Skeiky, 2006; Reece, 2008).

Após a fagocitose, os macrófagos, em conjunto com as células dendríticas, migram para os nódulos linfáticos onde apresentam os antígenos da micobactéria às células T que, por sua vez, tornam-se ativas e trafegam em direção ao pulmão, iniciando uma resposta do tipo T-Helper-1 (T_H1). A resposta imune pode levar de 18 a 20 dias para alcançar um nível efetivo e assim conter o crescimento bacteriano (Skeiky, 2006; Palomino, 2007; Reece, 2008; Cooper, 2009).

A interação dinâmica entre o *M. tuberculosis*, macrófagos e células T resulta em uma resposta inflamatória e na formação do granuloma, ou tubérculo, a principal característica da TB. O granuloma é inicialmente composto por células $CD4^+$ e $CD8^+$, no entanto, um conjunto complexo de células T, incluindo $CD4^+$, $CD8^+$, $\gamma\delta$ e $CD1\ \alpha\beta$ é recrutado para aumentar a resposta imune e conter a infecção. Posteriormente, o granuloma é cercado por uma parede fibrosa e estruturas foliculares que, por um lado, garantem um confinamento eficiente de micobactérias e demarcação do foco infeccioso, mas por outro, estão associados a danos irreversíveis ao tecido (Skeiky, 2006).

O granuloma pode persistir por décadas e conter a infecção em um estado de dormência, privando a micobactéria de oxigênio e nutrientes. No entanto, falhas na contenção da infecção podem resultar na liberação do microrganismo, com ativação da doença sintomática e contagiosa.

O centro do granuloma, eventualmente, sofre necrose caseosa devido à morte celular, mas pode ainda conter bacilos viáveis. Após esse fenômeno, o granuloma caseoso torna-se incapaz de conter a bactéria e, por ser um meio

favorável ao seu crescimento, estimula a sua multiplicação de modo que a infecção pode se disseminar para outros órgãos do hospedeiro. Casos de TB extra-pulmonar ocorrem em aproximadamente 15% dos pacientes que possuem a doença ativa. Em casos mais graves, a doença pode evoluir para a forma miliar, acometendo outras partes do corpo, tais como: pleura, glândulas linfáticas, fígado, baço, ossos e articulações, coração, cérebro, sistema uro-genital, meningis, peritônio e pele (Kaufmann, 2010b; Ducati, 2006).

2.3 Resposta imune inata e adaptativa

O sistema imune desempenha um papel fundamental no resultado da infecção pelo bacilo de Koch, sendo evidente a sua eficiência na contenção da infecção, uma vez que 90% das pessoas infectadas acabam não desenvolvendo a doença no decorrer de suas vidas. A resposta imune na TB é dividida em inata e adaptativa, sendo ambas mediadas por células e fatores humorais e, apesar de ser suficiente para controlar a progressão da doença, ela não é capaz de exercer a erradicação total do microrganismo (Paham, 2001).

2.3.1 Resposta Imune Inata

A imunidade inata corresponde à resposta do sistema imune durante o primeiro contato com um agente patogênico e confere proteção inespecífica contra uma ampla gama de invasores microbianos. Dentre os vários tipos de células do sistema inato estão os macrófagos, que estão na linha de frente na defesa contra a TB, os neutrófilos, os mastócitos, as células dendríticas e células natural killer, que serão detalhadas a seguir.

2.3.1.1 Macrófagos

Os macrófagos são as células pragmáticas no que diz respeito à infecção por *M. tuberculosis*, pois servem de habitat para o bacilo que, ao longo de sua existência, desenvolveu estratégias de sobrevivência que permitem sua persistência e replicação no interior destas células. Os macrófagos restringem o crescimento da micobactéria, no entanto, mesmo depois de ativados por citocinas, principalmente

interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), falham na erradicação total do bacilo (Palomino, 2007; Kaufmann, 2010b).

Experimentos *in vitro* sugerem que a resposta do macrófago depende do tipo de receptor com o qual a bactéria interage antes da internalização, que podem ser: receptores Fc, complemento, proteína surfactante, manose, CD14 e CD43. A interação com os receptores Fc aumenta a produção de intermediários reativos de oxigênio e permite a fusão das bactérias com lisossomos. Por outro lado, a interação das bactérias com o receptor 3 do complemento bloqueia a maturação dos fagossomos evitando assim que ocorra a fusão com os lisossomos (Palomino, 2007).

2.3.1.2 Células Dendríticas

As células dendríticas são as mais eficientes células apresentadoras de antígeno, sendo capazes de reconhecer, capturar e processar os mesmos. Após a maturação das células dendríticas, que ocorre em seguida da internalização do antígeno por endocitose, elas migram para os nódulos linfáticos periféricos e estimulam as células T auxiliares (Th) CD4 e CD8. A maturação é também acompanhada pelo aumento do número de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, bem como da produção das interleucinas IL-12, IL-18, IL-23 e, provavelmente, de INF- α e β , mas não INF- γ (Kaufmann, 2010b; Palomino, 2007).

2.3.1.3 Neutrófilos

Mesmo que os macrófagos sejam considerados o principal alvo de infecção pelo *M. tuberculosis*, recentemente, tem sido proposto que outras células possam também ser infectadas, tais como os neutrófilos. Estas células estão entre as primeiras a serem recrutadas nos locais acometidos por qualquer agente nocivo que invada o organismo. Além de possuírem mecanismos bactericidas já bem caracterizados, estão relacionadas com a formação de armadilhas extracelulares (Parhan, 2001; Palomino, 2007).

Os neutrófilos já foram detectados nos primeiros dias de infecção pelo bacilo, bem como vários dias após a infecção. Estudos com ratos mostraram que o crescimento microbiano é favorecido quando os neutrófilos são eliminados antes da

infecção; e, quando os animais foram tratados com agentes que promovem o aumento de neutrófilos, a taxa de crescimento microbiano foi diminuída. No entanto, quando a ação bactericida dos neutrófilos contra micobactérias foi avaliada, resultados controversos foram obtidos. Acredita-se porém, que o principal papel dos neutrófilos não diz respeito ao seu potencial bactericida, mas sim à capacidade de transferir suas próprias moléculas bactericidas aos macrófagos, de induzir a formação do granuloma e de produzir quimiocinas (Palomino, 2007).

2.3.1.4 Mastócitos

Os mastócitos são células que estão envolvidas nas reações alérgicas e no desenvolvimento de resposta do tipo Th2. São encontrados principalmente na mucosa do trato respiratório, gastrointestinal e urinário, sendo também observados nas proximidades dos vasos sanguíneos e linfáticos. Ao interagirem com o antígeno, os mastócitos liberam várias moléculas vasoativas, incluindo: histamina, heparina, leucotrienos, prostaglandina D2, TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-8, entre outros (Paham, 2001).

Os locais onde os mastócitos são encontrados são passagens comuns para agentes infecciosos e, devido à sua distribuição estratégica dentro do pulmão, têm um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra micobactérias. Estudos já demonstraram o aumento do número de mastócitos e sua degranulação nos pulmões dos animais experimentalmente infectados com *M. tuberculosis*. Além disso, já foi demonstrado que há uma interação entre mastócitos e *M. tuberculosis*, que desencadeia a liberação de mediadores como histamina, β -hexosamidase, IL-6 e TNF- α , que estão envolvidos na ativação de neutrófilos e na manutenção da integridade do granuloma (Palomino, 2007).

2.3.1.5 Células Natural Killer

A principal função das células *natural killer*, no contexto de imunidade inata, deve-se ao fato de serem as primeiras células a produzir INF- γ durante a resposta imune e também ao desenvolvimento de citotoxicidade nas células alvo. Esta citotoxicidade atua como reforço na ação dos macrófagos contra o *M. tuberculosis*. Embora estas células sejam importantes para a resposta imune no início da infecção, elas não são essenciais. (Palomino, 2007).

2.3.2 Resposta Imune Adaptativa

Ao contrário dos mecanismos inatos, a resposta imune específica ou adaptativa, requer um reconhecimento específico dos antígenos. O sistema imune inato tem uma profunda influência sobre o tipo de mecanismo imune adaptativo que é gerado, e vice-versa; a resposta imune específica executa várias de suas funções através da ativação dos componentes da imunidade inata (Parham, 2001).

A resposta imune específica é mediada principalmente pelos linfócitos T, os quais secretam efetores e moléculas mediadoras, e pelos linfócitos B, que produzem e maturam os anticorpos. Os primeiros são responsáveis pelo reconhecimento das células infectadas que possuem peptídeos específicos complexados à MHC, enquanto que os linfócitos B e os anticorpos são responsáveis pelo reconhecimento de material exógeno, como por exemplo, os antígenos extracelulares (Parham, 2001).

2.3.2.1 Resposta imune humoral e celular

Devido à localização intracelular do bacilo da TB, a resposta imune primária é mediada por células. Embora se acredite que o *M. tuberculosis* não entre em contato com anticorpos e que este tipo de resposta imune não seja eficaz, estudos demonstram que, nas primeiras etapas da infecção, os anticorpos sozinhos ou em conjunto com as citocinas adequadas, são capazes de exercer importantes funções, como prevenir a entrada do bacilo pelas mucosas (Palomino, 2007).

O componente do sistema imune que une as respostas humoral e celular são os linfócitos Th, que são produzidos por duas vias de maturação, Th1 ou Th2, e agrupados de acordo com sua diferenciação em CD4 e CD8. A resposta imune do tipo Th1 é de natureza celular e age principalmente sobre parasitas intracelulares e câncer. Esta resposta envolve diferenciação CD4 e CD8, com ativação de macrófagos, detecção e lise de células afetadas levando, assim, à formação dos granulomas. Por outro lado, a resposta do tipo Th2, que é de natureza humoral, age sobre antígenos e parasitas extracelulares. Para tanto, envolve diferentes subconjuntos de linfócitos T CD4 e CD8, podendo levar à destruição e necrose

tecidual, o que representa falha na resposta imune em muitas doenças (Ducati, 2006).

A imunidade contra a TB é localizada, o que significa que as consequências de uma lesão dependem da natureza das células T estimuladas. Se estas forem do tipo Th2, pode haver progressão da doença e a lesão evoluir para o estado de necrose, porém, se for do tipo Th1, a bactéria é destruída e ocorre a formação do granuloma, onde a lesão tende a sofrer regressão (Ducati, 2006; Mendieta, 2010).

3 ANTÍGENOS E ADJUVANTES NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

3.1 Antígenos do *M. tuberculosis*

O uso da biotecnologia tem permitido, cada vez mais, a descoberta de antígenos de *M. tuberculosis* com potencial para o desenvolvimento de novas vacinas e, até mesmo, de novos métodos de diagnóstico da doença. A publicação do genoma completo do bacilo, há duas décadas atrás, de fato acelerou a identificação de muitos antígenos, permitindo assim a incorporação dos mesmos em novos modelos de vacinas contra TB. No entanto, a obtenção destes antígenos em grandes quantidades é ainda hoje um processo demorado e custoso (Parham, 2001).

Os antígenos são apresentados, através das células apresentadoras de antígenos, às células T, na forma de pequenos peptídeos complexados ao MHC. Dentre os antígenos que constituem algumas das vacinas promissoras para prevenir a TB e que estão em ensaios clínicos constam:

Complexo Antigênico 85: os membros deste complexo são as principais proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis*, representadas pelos antígenos 85A, 85B e 85c, e são comuns a todas as micobactérias. Estas moléculas estão envolvidas na síntese da parede celular micobacteriana. As proteínas do complexo 85 induzem uma forte resposta celular e humoral e, por este motivo, estão entre as proteínas mais estudadas para o desenvolvimento de novas vacinas contra TB (Dietrich, 2006; Kaufmann, 2010b).

ESAT-6 (do inglês *6kDa- early secreted antigenic target*): é uma proteína que faz parte da família multigênica de proteínas imunodominantes ESAT-6. Essa proteína é considerada um fator de virulência e é expressa em muitas micobactérias, no entanto, está ausente no BCG. ESAT-6 tem sido um antígeno alvo de muitos estudos, visto que é reconhecido logo que a infecção ocorre. Descrições na literatura demonstram que, em humanos infectados, ESAT-6 induz a secreção de INF- γ pelas

células T. A proteína ESAT-6 é amplamente utilizada como reagente para o diagnóstico de infecção por TB, onde é capaz de discriminar o *M. tuberculosis* da vacinação prévia com BCG. Em alguns casos a proteína é substituída pelo antígeno TB10.4 para evitar resultados falso-positivos para a TB, após a imunização com vacinas contendo ESAT-6. Atualmente, existem muitas tentativas de complexação dessa proteína com adjuvantes, com o intuito de se obter novas vacinas para prevenir a TB (Aggerbeck, 2005; Dietrich, 2006; Kaufmann, 2010b; Kumar, 2010).

TB10.4: é uma proteína da família multigênica de proteínas imunodominantes ESAT-6. Este antígeno é expresso pelo *M. tuberculosis* e também pelo BCG. TB10.4 é fortemente reconhecido por pessoas com TB bem como vacinadas com a BCG e induz nesses indivíduos altos níveis de INF- γ (Dietrich, 2006).

Mtb32: é uma serina protease, enquanto Mtb39 é membro da família de proteínas PPE (prolina-prolina-ácido glutâmico), que estão localizadas na parede celular. Ambos antígenos estão presentes em *M. tuberculosis* e *M. bovis*, no entanto ausentes em espécies de micobactérias ambientais. Experimentos utilizando modelos animais de TB demonstraram que os antígenos Mtb32 e Mtb39 são imunogênicos e em ratos induziram resposta do tipo Th1 (Eschen, 2009; Skeiky, 1999; 2005).

3.2 Adjuvantes nas vacinas contra TB

No desenvolvimento de vacinas para TB, os adjuvantes são essenciais na indução da resposta imune quando combinados às vacinas de subunidades (no presente trabalho abordadas no item “4.2.2 *Proteínas Recombinantes*”), visto que estas não são capazes de gerar resposta imune forte e significativa (Parham, 2001).

Um adjuvante é definido como qualquer substância capaz de reforçar, acelerar ou prolongar a resposta imune específica contra um antígeno presente em uma vacina. A escolha de um adjuvante é influenciada por diversos fatores, tais como, a natureza dos antígenos aos quais o mesmo será associado e o tipo de resposta estimulada por ele. O adjuvante ideal para vacinas contra micobactérias é aquele que induz o aumento da resposta do tipo Th1, com concomitante inibição da resposta Th2 (Ducati, 2006; Parida, 2010; Statens Serum Institut, 2010).

Dentre os mecanismos pelos quais os adjuvantes atuam destacam-se: a) proteção contra a degradação e/ou eliminação dos antígenos; b) melhora da apresentação dos antígenos pelas células dendríticas; c) distribuição em células específicas e; d) indução de resposta celular do tipo T CD4+ e CD8+ (Mendieta, 2010).

Os adjuvantes que constam em formulações dos candidatos à vacina, que estão em ensaios clínicos, são os seguintes:

AS (do inglês *adjuvante system*): foi desenvolvido pela empresa GlacoSmithKline e é subdividido em diferentes tipos. Nos candidatos à vacina contra a TB constam o AS01 e AS02. O primeiro composto é formulado na forma de lipossomos, enquanto que o segundo é uma emulsão óleo-água. Ambos servem como depósito de liberação lenta de antígenos. AS01 é um potente estimulador das células Th1 e Th2, enquanto que AS02 estimula resposta humoral e celular do tipo Th1 (Kaufmann, 2010a).

IC31: este adjuvante desenvolvido pela Intercell é constituído por desoxioligonucleotídeos e peptídeos catiônicos. Os desoxioligonucleotídeos estimulam as células dendríticas mielóides e plasmacitóides, enquanto que os peptídeos catiônicos aumentam a absorção do antígeno pelas células apresentadoras de antígenos, promovendo um depósito de liberação lenta do mesmo. IC31 induz forte resposta do tipo Th1 CD4+ e CD8+, bem como estimula produção de anticorpos (Doherty, 2005; Kaufmann, 2010a; 2010b).

CAF01: é um potente adjuvante desenvolvido pela Statens Serum Institut (SSI). Na sua composição constam compostos de nitrogênio alifáticos e componentes da parede celular micobacteriana, ambos formulados em lipossomo catiônico. Este adjuvante é considerado muito eficaz, pois direciona o antígeno para as células dendríticas ativadas, além de induzir resposta imune humoral e celular (Kaufmann, 2010b; Mendieta, 2010; Statens Serum Institut, 2010).

4 VACINAS

A vacinação é atualmente considerada o maior triunfo da área da imunologia. O procedimento de imunização por vacinação é capaz de prevenir doenças severas através da exposição prévia ao agente infeccioso, em uma forma na qual não pode causar a doença. Desse modo, o sistema imune obtém a experiência necessária para elaborar uma resposta protetora com pouco risco para a saúde. Embora as primeiras vacinas tenham sido desenvolvidas por processos de tentativa e erro, a atual compreensão dos mecanismos de imunidade permite o desenvolvimento racional de vacinas e técnicas de imunização (Parham, 2001).

No presente trabalho, as vacinas contra a TB que atualmente estão em desenvolvimento foram divididas em dois grupos principais: as vacinas de pré-exposição e as de pós-exposição ao bacilo. As primeiras, cuja função é prevenir a infecção, seriam administradas aos indivíduos que ainda não tiveram contato com *M. tuberculosis*, enquanto que as últimas seriam dadas aos indivíduos já infectados ou previamente imunizados com a BCG e, por esse motivo, têm a função de proteger o indivíduo contra a ativação da doença.

Se a vacinação com a BCG em neonatos é capaz de gerar imunização por um período limitado, deve-se então partir para o desenvolvimento de uma nova vacina de pré-exposição substituinte da BCG, que seja capaz de gerar proteção por longo período. Outra alternativa é o desenvolvimento de vacina pós-exposição que reforce a proteção em adultos.

No contexto atual da TB, a melhor tática de profilaxia seria a combinação de ambas as estratégias de vacinação. O regime de vacinação múltipla, que incluiria a vacinação neonatal em conjunto com a de reforço em adultos (administrada em intervalos de 10 anos), pode conferir a imunização requerida a longo prazo (**Figura 3**). Embora esta seja uma estratégia esperançosa, não foram demonstrados efeitos benéficos no estudo que avaliou o programa de revacinação por BCG em Hong Kong e no Brasil, o que corrobora a ineficácia da proteção da BCG em adultos (Doherty, 2005; Ly, 2008).

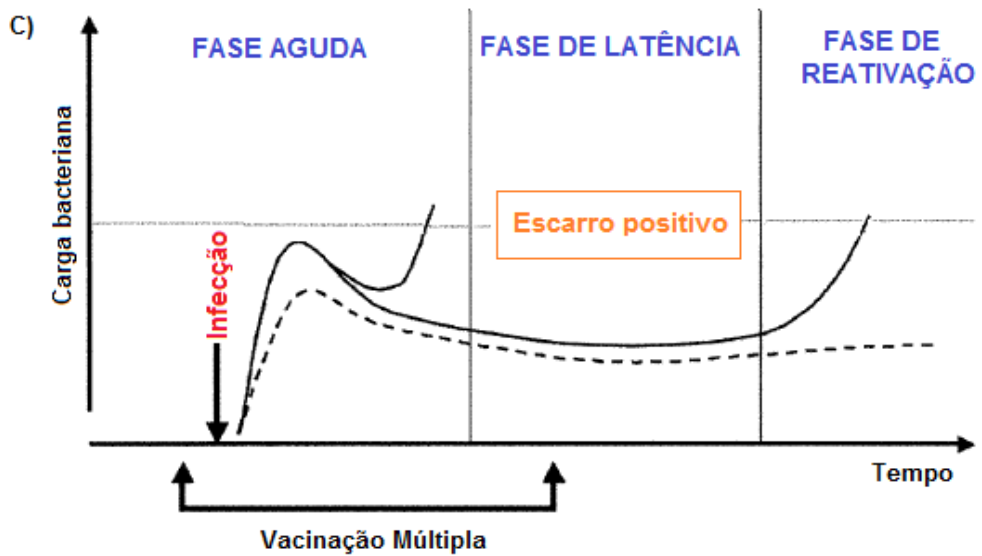
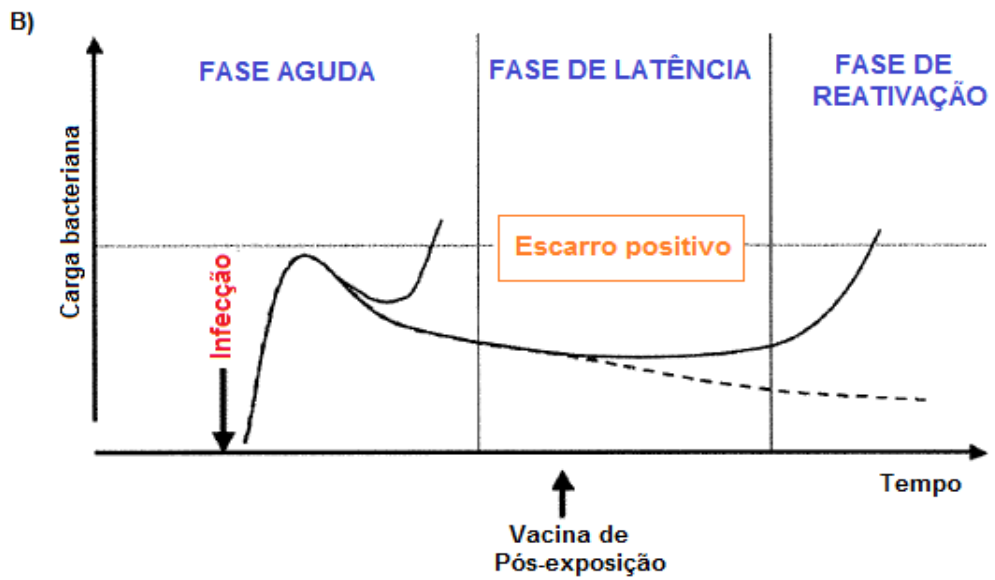
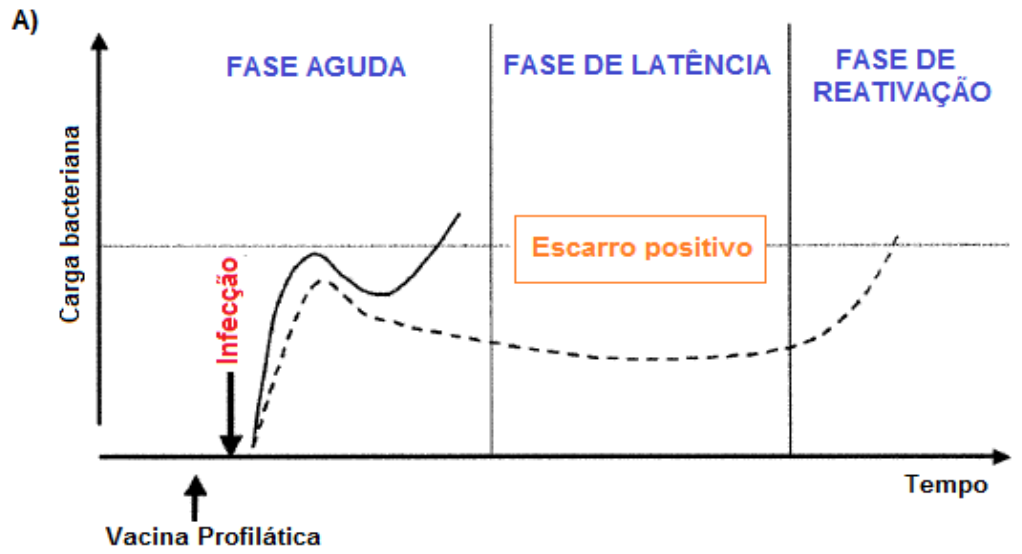


Figura 3. Modelo esquemático do efeito da vacinação (A) pré-exposição, (B) pós-exposição e (C) vacinação múltipla. O curso da infecção pelo *M. tuberculosis* (linha preta) é caracterizado por um aumento na carga bacteriana até que a resposta imune se desenvolva, a partir de então o crescimento bacteriano é invertido. Em uma minoria de indivíduos (3-5%), as bactérias escapam do controle e começam a se expandir novamente, resultando em TB ativa, com positividade do escarro. (A) A vacinação de pré-exposição acelera o desenvolvimento desta resposta imune, levando a detenção do crescimento bacteriano e prevenção da infecção de tornar-se sintomático. No entanto, na maioria dos indivíduos infectados, a infecção inicial pode ser controlada, mas a erradicação total do bacilo não é alcançada. Em vez disso, o *M. tuberculosis* estabelece uma infecção latente, que mais tarde pode ser reativada, causando a TB ativa. (B) A vacinação de pós-exposição tem como objetivo fortalecer a vigilância imunológica para prevenir a reativação, mas não pode impedir os casos que surgem durante a infecção aguda. (C) Uma estratégia de vacinação múltipla hipotética, não só inibe a infecção de se tornar sintomática, mas também previne reativação posterior. Uma importante consequência de se prevenir a reativação é que, se a carga bacteriana é reduzida, não só a doença é prevenida, mas o ciclo de transmissão é interrompido. Fonte: adaptado de Doherty, 2005.

Quando o tema é desenvolvimento de vacinas, as prioridades são eficácia e segurança. A OMS estima que 70% de eficácia contra infecção primária por TB é o limite mínimo de eficácia para uma vacina. Também preconizam que qualquer nova vacina para TB deve ser mais segura que a BCG, especialmente para ser administrada em portadores de HIV e que não necessite a realização de testes que avaliam o status HIV na pré-vacinação (BIO Ventures for Global Health, 2006).

O requerimento necessário para as vacinas de pré e pós-exposição são diferentes. Enquanto as primeiras necessitam demonstrar superior eficácia que a BCG, as vacinas de pós-exposição não necessitam. No entanto, estas devem ser efetivas em indivíduos já sensibilizados (Doherty, 2005).

Recentemente, um vasto número de candidatos à nova vacina para TB tem sido desenvolvido. Muitos destes já mostraram resultados promissores quando testados em animais e também em humanos.

A maioria dessas vacinas é destinada à superexpressão de antígenos do bacilo que são reconhecidos pelo sistema imune. Dentre os diferentes enfoques constam: o desenvolvimento de vacinas baseadas na atenuação do *M. tuberculosis* e também do *M. bovis*, vacinas recombinantes a partir do BCG, vacinas de proteínas de fusão recombinantes associadas a adjuvantes, vacinas de vetores virais não replicantes ou com replicação deficiente.

Nesta revisão priorizamos os candidatos que já estão em fase de testes clínicos, ou seja, aqueles que já foram testados e aprovados nos testes pré-clínicos. Além disso, os mesmos foram divididos nas categorias pré e pós-exposição. Objetivando facilitar a compreensão das fases que compreendem os estudos clínicos, segue a **Tabela 1**.

Tabela 1. Fases que compreendem os estudos clínicos.

Fase	Descrição
Fase I	Os ensaios de Fase I são realizados com um pequeno número de voluntários (40-90 indivíduos adultos e saudáveis). Nestes ensaios visa-se garantir a segurança da vacina, detectam-se reações imunológicas e começa-se a determinar os níveis de dosagem. Onze candidatos à vacina contra TB já passaram por esta fase.
Fase II	Os ensaios de Fase II envolvem um número maior de voluntários - a partir de algumas centenas a milhares. Nestes ensaios é dada continuidade aos testes de segurança, determinam-se os níveis de dosagem ideal, via de administração e o calendário de vacinação. Também são coletados dados preliminares sobre a eficácia na prevenção da TB. Nesta fase são inscritos voluntários de várias idades e condições de saúde, incluindo os infectados com HIV. Quatro candidatos à vacina contra TB encontram-se nesta fase.
Fase III	Os ensaios de Fase III envolvem muitos milhares de participantes e é nesta etapa em que se determina se o candidato à vacina é de fato eficaz contra a TB.

4.1 Vacinas pré-exposição (substituintes da BCG)

As vacinas candidatas a substituírem a BCG devem demonstrar eficácia e segurança superior à mesma, inclusive em indivíduos HIV positivos. Os principais candidatos que correspondem a este grupo derivam da atual vacina BCG, sendo denominados, portanto, BCG recombinantes (rBCG).

4.1.1 rBCG

Atualmente existem duas vacinas rBCG em estudos clínicos de fase I. Os resultados pré-clínicos sugerem que ambas as vacinas são mais potentes e seguras que a atual BCG (**Tabela 2**) (Barker, 2009; Kaufmann, 2010b).

O candidato rBCG30, que encontra-se em ensaios clínicos de fase I, é derivado da cepa BCG Tice e geneticamente modificado para superexpressar o antígeno 85B. Os testes de fase I já demonstraram que rBCG30 induz aumento significativo de células CD4+ e CD8+, células T de memória e também específicas para o antígeno 85B. Esse candidato foi o primeiro a demonstrar a indução do sistema imune de modo substancialmente maior que o BCG. A replicação limitada da vacina *in vivo* é outro fator que colabora para a segurança do uso da mesma em indivíduos imunocomprometidos. Estudos utilizando cobaias, previamente vacinadas com BCG, reportaram que rBCG30 aumentou a imunidade das mesmas, o que

sugere que este candidato também poderia ser utilizado como reforço da BCG (Hoft, 2008; Lambert, 2009; Ly, 2008).

Tabela 2. Vacinas candidatas à substituição da BCG que já estão em etapas clínicas.

Vacina	Origem	Etapa	Descrição
BCG recombinante			
rBCG30	University of Califórnia/ Aeras	Fase I	rBCG superexpressando o antígeno 85B (<i>Rv1886</i>)
rBCG Δ ure::hly (VPM1002)	TB Vaccine Initiative/ Max Plank Institut/ Vakzine Projekt Managment	Fase I	rBCG superexpressando listeriolisina e com deleção da urease

O VPM1002 também é derivado de uma cepa de BCG geneticamente modificada, onde o gene codificante da enzima urease foi deletado e o gene codificante da listeriolisina (Hly) de *Listeria monocytogenes* foi inserido. A Hly tem a propriedade de perfurar a membrana do fagossomo das células infectadas, facilitando assim a apresentação dos antígenos às células T. A deficiência de urease tem como objetivo favorecer o pH ácido no fagossomo, ideal para a atividade da Hly. Os resultados dos ensaios clínicos de fase I corroboram os resultados dos ensaios pré-clínicos, onde o candidato VPM1002 foi de fato considerado mais seguro e imunogênico que o BCG. Em humanos, VPM1002 induziu uma forte resposta imune do tipo Th1, de modo que também poderia ser eficaz na vacinação de indivíduos previamente imunizados com BCG (Kaufmann, 2010b; Lambert, 2009; Vakzine Projekt Management, 2010).

4.2 Vacinas pós-exposição (vacinas de reforço)

Considerando que em termos mundiais muitos indivíduos não são vacinados com a BCG na infância, mesmo nas áreas onde esta vacinação é rotina, as vacinas de reforço devem ser capazes de estimular de modo efetivo uma resposta primária. Outro ponto a ser destacado, é que grande parte dos indivíduos a serem vacinados

já tiveram um primeiro contato com o bacilo e, muito possivelmente, estejam infectados com a forma latente, principalmente em regiões endêmicas.

Existem candidatos à vacina de reforço que já estão em etapas de estudos pré-clínicos e clínicos. A maior parte destas vacinas experimentais incorpora antígenos do *M. tuberculosis* que são secretados no início da infecção, mas também pesquisas têm sido realizadas sobre antígenos relacionados com etapas posteriores, como as de latência e liberação do bacilo após o período de dormência. Os principais candidatos concentram-se em três grupos: a) vetores virais que expressam um ou mais antígenos imunodominantes de *M. tuberculosis*; b) proteínas recombinantes combinadas com adjuvantes, onde são todas proteínas de fusão de dois ou mais antígenos e; c) micobactéria e/ou fragmentos desta inativados (**Tabela 3**) (Barker, 2009; Kaufmann, 2010b).

As vacinas de proteínas recombinantes necessitam de adjuvantes que promovam resposta do tipo Th1. Já as vacinas de vetores virais não necessitam associação com estes adjuvantes, mas em contrapartida podem ser inibidas pela prévia exposição do vetor. Os vetores virais desencadeiam uma resposta imune do tipo Th1 dominante devido à expressão heteróloga dos antígenos, além de induzirem resposta celular do tipo T CD8 (Kaufmann e Hussey, 2010).

Tabela 3. Vacinas candidatas ao reforço da BCG que já estão em etapas clínicas.

Vacina	Origem	Etapa	Descrição
Vetores virais			
MVA85A/AERAS-	Oxford/Aeras	Fase IIb	Vacínia modificada Ankara expressando o antígeno 85A (<i>Rv3804</i>)
Crucell Ad35/AERAS-402	Crucell/Aeras	Fase II	Adenovírus 35 deficiente em replicação, expressando os antígenos: 85A (<i>Rv3804</i>), 85B (<i>Rv1886</i>) e TB10.4 (<i>Rv0288</i>)
AdAg85A	McMaster University	Fase I	Adenovírus 5 deficiente em replicação, expressando o antígeno 85A (<i>Rv3804</i>)
Proteínas recombinantes associadas a adjuvantes			
H1-CAF01	Statens Serum Institut/ TB Vaccine Initiative	Fase I	Fusão recombinante dos antígenos 85B (<i>Rv1886</i>) e ESAT-6 (<i>Rv3875</i>) no adjuvante CAF01
H1-IC31	Statens Serum Institut/ TB Vaccine Initiative	Fase I e IIa	Fusão recombinante dos antígenos 85B (<i>Rv1886</i>) e ESAT-6 (<i>Rv3875</i>) no adjuvante IC31

H4-IC31 (AERAS-404)	Statens Serum Institut/ Aeras/ Sanofi Pasteus/ Intercell	Fase I	Fusão recombinante dos antígenos 85B (<i>Rv1886</i>) e TB10.4 (<i>Rv0288</i>) no adjuvante IC31
M72	GlacoSmithKline/ Aeras/ TB Vaccine Initiative	Fase II	Fusão recombinante dos antígenos Mtb39 (<i>Rv1196</i>) e Mtb32 (<i>Rv0125</i>) nos adjuvantes AS01 e AS02
<i>Micobactéria e/ou fragmentos inativados</i>			
RUTI	Archivel Farma/ Unitat de TB	Fase I	Fragmentos de <i>M. tuberculosis</i>
<i>M. vaccae</i>	National Institut of Health/ SR Pharma	Fase III	<i>M. vaccae</i> inativado
Fase IIa: crianças e adolescentes; Fase IIb: crianças e adultos HIV-positivos.			

4.2.1 Vetores virais

Dentre os candidatos à vacina do tipo vetores virais, o mais avançado em termos de estudos clínicos é o MVA85A/AERAS-485, que é composto pelo vírus modificado Ankara, que possui replicação deficiente e expressa o antígeno 85A de *M. tuberculosis*. O candidato já passou com sucesso através dos ensaios clínicos de Fase I, que ocorreram no Reino Unido, Gâmbia e África do Sul, bem como nos ensaios de Fase II, na África do Sul e Gâmbia. Atualmente encontra-se em estudo clínico de Fase IIb, que ocorre na África do Sul com 2.784 crianças. Dados obtidos a partir dos ensaios clínicos já demonstraram que este candidato é potencialmente imunogênico e seguro para uso em humanos, induzindo uma resposta forte e duradoura polifuncional celular do tipo T CD4+ em voluntários humanos (Doherty, 2009; Aeras, 2010; Kaufmann, 2010b; Scriba, 2010).

Os candidatos Crucell Ad35/AERAS-402 e Ad5Ag85A, utilizam adenovírus com replicação deficiente como vetor. O primeiro expressa os antígenos 85A, 85B e TB10.4, enquanto o segundo expressa somente o 85A. A família dos adenovírus possui DNA dupla fita e um histórico excelente de segurança em humanos. O uso de adenovírus como vetor é também muito atrativo devido à sua afinidade pelas vias

aéreas e forte estimulação de células T CD8+ (Aeras, 2010; Kaufmann, 2010b, Parida, 2010). No entanto, as infecções por adenovírus em humanos são frequentes, de modo que a prévia existência de anticorpos contra estes microrganismos pode prejudicar a eficácia dos mesmos como vacina. Os anticorpos contra adenovírus 5 são mais prevalentes na população do que os contra adenovírus 35. Estudos com vacinas contra o HIV, contendo vetor adenovírus 5, demonstraram não haver relação entre a pré-existência destes anticorpos com a eficácia da vacina (Kaufmann, 2010a). Outros estudos clínicos variados também já observaram a não interferência dos mesmos anticorpos com vacinas que utilizam adenovírus como vetor (Parida, 2010).

Já foi demonstrado que Crucell Ad35/AERAS-402 induz reposta robusta e polifuncional celular T CD4+ e CD8+. Atualmente, já foram concluídos ensaios de Fase I nos Estados Unidos, sendo que mais estudos de Fase I ainda estão sendo realizados na África do Sul, Quênia e Estados Unidos. A Fase II de estudos clínicos está sendo conduzida na África do Sul, Quênia, Moçambique e Uganda (Abel, 2010; Aeras, 2010).

Até o presente momento não foram apresentados resultados a respeito do ensaio de Fase I no qual se encontra o candidato Ad5Ag85A, que está sendo desenvolvido no Canadá.

4.2.2 Proteínas recombinantes

As vacinas constituídas por proteínas recombinantes são consideradas vacinas de subunidade e, para tanto, necessitam associações com adjuvantes que induzam a resposta imune, pois caso contrário, essas vacinas não seriam capazes de gerar resposta adequada, uma vez que são pouco imunogênicas.

O candidato H1-IC31 é composto pelos antígenos 85B e ESAT-6 associados ao adjuvante IC31. O mesmo já foi incluído em dois ensaios distintos de fase I e atualmente um destes evoluiu para etapa de fase IIa. Até o momento, estudos revelam que a vacina tem sido bem tolerada e efeitos adversos relevantes não foram registrados. H1-IC31 induz resposta imunogênica forte e persistente do tipo Th1 antígeno específico. O grupo de pesquisas SSI recentemente publicou que esta resposta é mantida por até dois anos e meio, demonstrando assim excelente resposta de memória (Kaufmann, 2010b; Statens Serum Institut, 2010).

O desenvolvimento do candidato H4-IC31, pelos grupos Aeras e SSI, foi uma alternativa ao H1-IC31, onde o antígeno ESAT-6 foi substituído pelo TB10.4 com o intuito de diminuir os riscos no diagnóstico de TB baseado na análise de ESAT-6 (Kaufmann e Hussey, 2010). Os ensaios clínicos de fase I com o candidato H4-IC31 já estão ocorrendo na Suécia, Finlândia e África do Sul e os resultados obtidos até então são muito semelhantes ao do candidato H1-IC31 (Aeras, 2010; Statens Serum Institut, 2010).

Outro candidato, também do grupo SSI, é o H1-CAF01, que assim como o H1-IC31, possui os antígenos 85B e ESAT-6, porém associados ao adjuvante CAF. O H1-CAF01 está em ensaio clínico de fase I e até o momento não existem dados publicados sobre este estudo; todavia, nos testes pré-clínicos foi observada a indução forte de resposta imune do tipo Th1 e Th17 (Parida, 2010).

Eschen e colaboradores publicaram os primeiros dados clínicos da vacina M72/AS02, composta pela fusão dos antígenos Mtb32 e Mtb39 no adjuvante AS02. Os resultados são promissores, pois mostraram um nível de segurança aceitável e boa resposta humoral e celular, sendo que ambas as respostas imune persistiram por 6 meses após a última dose (Eschen, 2009). Esta foi a primeira vacina recombinante contra a TB a ser testada em humanos e, atualmente, os ensaios clínicos de fase II estão ocorrendo na África do Sul e Gâmbia (Aeras, 2010; Palomino, 2007).

4.2.3 Micobactéria e/ou fragmentos inativados

A micobactéria inativada *M. vaccae* é o candidato à vacina mais avançado nos ensaios clínicos e encontra-se em fase III. Essa micobactéria não é patogênica e a sua forma de inativação, que ocorre pelo calor, é suficientemente segura para a imunização de humanos. Os resultados dos estudos de fase I e II, demonstraram que a vacina é altamente imunogênica e eficaz quando administrada na forma de doses múltiplas em indivíduos HIV-positivos previamente imunizados com o BCG na infância (Reyon, 2010).

O candidato RUTI é formado por fragmentos do *M. tuberculosis* e encontra-se em fase I de estudos clínicos. Para obtenção desta vacina, o *M. tuberculosis* é cultivado em condições de estresse e, em seguida é fragmentado, desintoxicado e formulado em lipossomas. A abordagem terapêutica deste candidato é um pouco

diferente das demais, pois a vacina é combinada ao tratamento com o antimicrobiano isoniazida, ou seja, é administrada ao paciente já infectado com o bacilo da TB em tratamento, agindo também na TB latente. Os resultados são promissores, pois foi demonstrado que a vacina é imunogênica e não tóxica para humanos. Outro fato importante a ser destacado é que o uso concomitante de isoniazida e RUTI possibilita a diminuição do tratamento da TB para um mês (Archivel Farma, 2010).

4.3 Vacinas com Ácidos Nucléicos

Uma abordagem interessante, ainda não abordada no presente trabalho, diz respeito ao desenvolvimento de vacinas codificadas com o gene da proteína de choque térmico de 65kDa (DNA-HSP65) de *M. leprae*. Franco e colaboradores analisaram a ativação de células dendríticas e macrófagos humanos quando cultivados com DNA-HSP65. Como resultado dessa análise, observou-se que os macrófagos produziram altos níveis de TNF- α , IL-6 (pró-inflamatória) e IL-10 (antiinflamatória). Além disso, eles também apresentaram uma atividade microbicida maior do que a observada nas células dendríticas após infecção com *M. tuberculosis*. Por outro lado, as células dendríticas produziram altos níveis de IL-12 e baixos níveis de TNF α , IL-6 e IL-10.

Souza e colaboradores testaram a vacina DNA-HSP65, formulada em lipossomos, em ratos e os resultados foram promissores, demonstrando eficácia da vacina no desenvolvimento de imunidade contra o *M. tuberculosis*, tornando o candidato DNA-HSP65 uma estratégia relevante para modulação da resposta imune no desenvolvimento de novas vacinas para prevenir a TB (Souza, 2008).

5 CUSTOS E FUNDOS

O desenvolvimento de novas vacinas é um processo muito custoso, ainda mais quando se trata da prevenção de uma doença negligenciada como a TB. Embora o número de financiadores tenha crescido nos últimos anos, os recursos financeiros ainda não são suficientes para a implementação de uma nova vacina nos próximos anos.

O programa Stop TB da OMS estima que o custo de uma nova vacina anti-TB a ser licenciada até 2015, seja de aproximadamente 3 a 5 bilhões de dólares, e que atualmente não há um financiamento de mais de 1 bilhão. Dentre os anos 2007-2008 foram disponibilizados 400-500 milhões de dólares por ano para pesquisa em TB; cerca de 15-20% destes fundos foram destinados especificamente para vacinas, enquanto que 20-25% para ciência básica, onde parte foi dedicada ao desenvolvimento de novas vacinas (Kaufmann; Hussey, 2010).

Embora o desenvolvimento de uma vacina anti-TB tenha um custo elevado, a previsão de retorno do investimento é promissor e excederá largamente os custos iniciais, visto que se trata da prevenção de uma doença global que um terço da população mundial possa vir a desenvolver. Dentre os principais financiadores da pesquisa e desenvolvimento de vacinas anti-TB, constam a Fundação Bill e Melinda Gates, que em conjunto com Welcome Trust representam o setor filantrópico de doações, enquanto que o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos e a Comissão Europeia representam o setor público (BIO Ventures for Global Health, 2006; Kaufmann; Hussey, 2010).

“Acreditamos que investir em uma nova vacina contra a TB constituiria a melhor esperança de longo prazo para a eliminação da TB” (Carta de 2010 de Bill Gates, publicada no site da sua fundação – <http://www.gatesfoundation.org/>).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas para prevenir a TB representam uma urgente necessidade à saúde pública mundial. Embora isso envolva políticas governamentais, financiamento e transferência de tecnologia, um melhor entendimento sobre a interação do bacilo *M. tuberculosis* com o sistema imune do hospedeiro é indispensável para que as futuras estratégias de vacinação sejam mais efetivas na prevenção da doença do que a atual estratégia de vacinação pela BCG.

Com uma nova vacina segura e eficaz contra TB, milhões de mortes serão evitadas de modo a diminuir significativamente a morbidade, causando um grande impacto no setor público de saúde. Embora ainda se tenha muito trabalho e desafios pela frente, é importante ressaltar que além do desenvolvimento de novas vacinas para TB, é crucial que se garanta a segurança destas inovações. Outro desafio é fazer com que a população tenha acesso a estes produtos, principalmente as populações mais acometidas pela doença.

Além disso, o desenvolvimento de novas vacinas contra TB que possam ser utilizadas de modo seguro pelos indivíduos HIV-positivos com certeza reduzirão também a morbidade deste grupo, visto que, entre estas pessoas, a TB é a principal causa de morte.

O ponto de início ideal para o planejamento de uma vacina envolve um conhecimento abrangente de como o sistema imune humano responde à infecção particular e que mecanismos permitem que o patógeno seja rapidamente eliminado pelo organismo. A TB se desenvolve vagarosamente, isso significa que dados confiáveis resultantes de estudos de segurança e eficácia de novas vacinas duram décadas e envolvem um vasto número de participantes. Tudo isto gera um custo econômico elevado e não atrativo, tanto para os pesquisadores quanto aos sistemas de saúde. No entanto, não podemos ficar parados assistindo aos danos que esta doença milenar continua provocando na população mundial.

REFERÊNCIAS

Abel, B. *et al.* The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 12, p.1404-1417, 2010.

Aeras Global TB Vaccine Foundation. **[Vaccine portfolio and development]**. Disponível em: <<http://www.aeras.org/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2010.

Aggerbeck, H.; Madsen, S.M. Safety of ESAT-6. **Tuberculosis**, v. 86, p. 363-373, 2006.

Archivel Farma. **[The RUTI Vaccine]**. Disponível em: <http://www.archivelfarma.com/hipotesi_an.html>. Acesso em: 23 de novembro de 2010.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: Informação e documentação de referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **NBR 14724**: Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – Apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

Barker, L.F. *et al.* Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 331-338, 2009.

BIO Ventures for Global Health. **[Tuberculosis vaccines: the case for investment]**. Disponível em: <<http://www.bvgh.org/LinkClick.aspx?fileticket=e-N-983i4ZY%3d&tabid=91>>. Acesso em: 15 de setembro de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **[Tuberculose]**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527> Acesso em: 24 de outubro de 2010.

Cole, S.T. *et al.* Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. **American Society for Microbiology**, Washington, 2005.

Cooper, A.M. Cell Mediated Immune Responses in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 393-422, 2009.

Daniel, T.M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

Doherty, T.M.; Andersen, P. Vaccines for Tuberculosis: novel Concepts and Recent Progress. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 687-702, 2005.

Ducati, R.G. *et al.* The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 697-714, 2006.

Eschen, K.V. *et al.* The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A. **Human Vaccines**, v. 5, p. 475-482, 2009.

Franco, L.H. *et al.* A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 6, 2008.

Hoft, D. F. *et al.* A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 1941-1501, 2008.

Kaufmann, S.H.E. Future Vaccination Strategies against Tuberculosis: thinking outside the box. **Immunity**, v. 33, p. 567-577, 2010a.

____. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, p. 337-353, 2010b.

Kaufmann, S.H.E.; Hussey, G.; Lambert, P.H. New vaccines for tuberculosis. **The Lancet**, v. 375, p. 2110-2119, 2010.

Kumar, M. *et al.* Immune response to Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 among south Indian. **Tuberculosis**, v. 90, p. 60-69, 2010.

Lambert, P.H. *et al.* New vaccines against tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 811-826, 2009.

Ly, L.H.; McMurray, D.N. Tuberculosis: vaccines in the pipeline. **Expert Reviews Vaccines**, v. 7, p. 635-650, 2008.

Mendieta, S.A.M.; Zavaleta, L.R.; Sanoja, R.R. Adjuvants in tuberculosis vaccine development. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 58, p. 75-84, 2010.

Parida, S.K.; Kaufmann, S.H.E. Novel tuberculosis vaccines on the horizon. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 374-384, 2010.

Palomino, J.C.; Leão, S.C.; Ritacco, V. **Tuberculosis 2007**: from basic science to patient care. Disponível em: <www.TuberculosisTextbook.com>. Acesso em: 13 de outubro de 2010.

Parham, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

Reece, S.T.; Kaufmann, S.H.E. Rational design of vaccines against tuberculosis direct by basic immunology. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 143-150, 2008.

Reyn, C.F.V. *et al.* Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette–Guérin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterial vaccine. **AIDS**, v. 24, p. 675-685, 2010.

Scriba, T.J. *et al.* Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 279-290, 2010.

Statens Serum Institut. **[Research and Development- vaccines-tuberculosis]**. Disponível em: <<http://www.ssi.dk/English/R%20and%20D/Vaccines/Tuberculosis.aspx>>. Acesso em: 19 de novembro de 2010.

Skeiky, Y.A.W. *et al.* Cloning, Expression, and Immunological Evaluation of Two Putative Secreted Serine Protease Antigens of Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3998-4007, 1999.

Skeiky, Y.A.W.; Sadoff, J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 469-476, 2006.

Souza, P.R.M. *et al.* Protective efficacy of different strategies employing Mycobacterium leprae heat-shock protein 65 against tuberculosis. **Opinion on Biological Therapy**, v. 8, p. 1255-1264, 2008.

Vakzine Projekt Management. **[Tuberculosis Vaccine]**. Disponível em: <<http://www.vakzine-manager.de/index.php?id=169&L=1>>. Acesso em: 23 de novembro de 2010.

Velayati, A.A. *et al.* Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli. **CHEST**, v. 136, p. 420-425, 2009.

World Health Organization. **[2007-2008 XDR & MDR Tuberculosis Global Response Plan]**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_HTM_TB_2007.387_eng.pdf>. Acesso em: 15 de setembro de 2010a.

_____. **[Global Tuberculosis Control 2010]**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf>. Acesso em: 19 de novembro de 2010b.

_____. **[Global Tuberculosis Control: a short update to the 2009 report]**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/>. Acesso em: 15 de setembro 2010c.

_____. **[Immunization, vaccines and biological]**. Disponível em: <www.who.int/immunization/topics/tuberculosis/en/index.html>. Acesso em: 18 de setembro de 2010d.

____. **[Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response]**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf>. Acesso em: 28 de setembro de 2010e.