



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO BIOMÉDICO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

## **Imunidade celular a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com Artrite Reumatóide**

*Marcela da Silva Sousa*

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Rio de Janeiro  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Imunidade celular a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em  
pacientes com Artrite Reumatóide

**Marcela da Silva Sousa**

Trabalho realizado nos Laboratórios de Imunopatologia (LIP), Departamento de Patologia e Laboratórios, da Faculdade de Ciências Médicas/UERJ e Microbiologia Celular, do Departamento de Micobacterioses, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ sob orientação do professor Geraldo Moura Batista Pereira.

Banca Examinadora:

*Dr. José Hermógenes Rocco Suassuna*  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

*Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro*  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

*Dra. Marilza de Moura Ribeiro Carvalho*  
Fundação Oswaldo Cruz

*Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Suplente)*  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

*Dra. Maria da Graça Araújo Baruque (Suplente)*  
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
31 de março de 2006

**SOUSA, Marcela da Silva**

Imunidade celular a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com Artrite Reumatóide

x, 104p.:il.

Dissertação de mestrado em Ciências Médicas - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

Orientador: Geraldo Moura Batista Pereira

1. Imunidade Celular; 2. Artrite Reumatóide; 3. *Mycobacterium tuberculosis*

I. Geraldo Moura Batista Pereira. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas. III Título

**Aos meus pais Francisco e Neyde,  
com meu amor e minha gratidão.**

## AGRADECIMENTOS

*Em especial, agradecer aos meus pais, Francisco e Neyde, por seu empenho em minha educação, carinho e colaboração neste momento em que abro meus horizontes; Minhas irmãs, Franci e Márcia, e meu sobrinho Rafael, pelo carinho e apoio.*

\*\*\*\*\*

*À querida Renata Mota, amiga de todas as horas e por compreender minha ausência; À Marjorie Guimarães, que além de amiga do peito, contribuiu muito para este projeto; À Simone Lima por sua amizade, ouvido e apoio; Iris Alvim e Danuza Esquenazi por terem me ensinado muito do que sei sobre técnicas laboratoriais, pelo incentivo, colaboração e carinho; Mônica Lima e Sandra Santos por suas palavras de conforto e incentivo; Ao Geraldo Pereira, meu chefe e orientador, por ter acreditado em meu potencial desde o início, me dando a chance de mostrar minhas aptidões e por orientar este projeto; Ao pessoal do Departamento de Micobacterioses/FIOCRUZ: Elisa, Lúcia, Solange e Paulo, pela ajuda com o material e organização; Pedro, por sua eficiência; À Rose Teles pelo apoio no fornecimento dos peptídeos; À Marilza pela participação na banca de qualificação e por dicas muito importantes para a finalização deste projeto; Ao pessoal da Faculdade de Ciências Médicas/HUPE: Ao Dr. Geraldo Castelar, por sua participação na banca de qualificação e seu papel fundamental na elaboração e continuidade deste projeto; À Profa. Dayse por sua participação na banca de qualificação e incentivo; Márcia e Rafaela por suas presenças, sorrisos e apoio; À Bióloga Simone Offrede pela ajuda na coleta das amostras de sangue; Erasmo e Lúcia, do Laboratório de Imunologia/HUPE, pela simpatia e realização dos testes tuberculínicos; À secretária Alessandra Anastácio pelo apoio com os trâmites burocráticos do curso; Aos professores das disciplinas cursadas por mim neste programa; Aos pacientes participantes deste estudo que voluntariamente contribuíram não só para meu desenvolvimento mas também para a pesquisa científica; A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este projeto acontecesse.*

\*\*\*\*\*

*À Força que existe em todos nós, me dando tranqüilidade e saúde para finalizar este projeto.*

## ÍNDICE GERAL

---

RESUMO	01
ABSTRACT	02
LISTA DE ABREVIATURAS	03
INTRODUÇÃO	06
A Tuberculose .....	07
Etiologia .....	07
Transmissão e mecanismo de infecção .....	07
Tipos de tuberculose .....	08
Diagnóstico .....	09
Sintomas .....	10
Tratamento .....	10
Prevenção .....	11
Epidemiologia .....	11
Tuberculose oportunista .....	12
A Artrite Reumatóide .....	13
Etiologia .....	14
Sintomas .....	15
Imunopatologia .....	17
Diagnóstico .....	19
Tratamento e efeitos colaterais .....	19
A tuberculose em pacientes com artrite reumatóide .....	20
Terapias biológicas e Tb .....	20
Sensibilidade na detecção de resposta ao <i>M. tuberculosis</i> .....	23
O PPD e a detecção de exposição ao <i>M. tuberculosis</i> em pacientes com AR .....	25
OBJETIVOS	28
POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAL E MÉTODOS	30
POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	31
MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
Teste tuberculínico – PPD RT23 cutâneo .....	31
Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS) .....	32

Quantificação de subpopulações de linfócitos T específicos para antígenos micobacterianos .....	32
Dosagem de IFN $\gamma$ nos sobrenadantes de culturas por ELISA .....	33
Análise gráfica dos dados .....	34
Esquema 1. Fluxograma resumindo os métodos experimentais usados neste estudo .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
Dados clínicos e resposta <i>in vivo</i> dos pacientes com AR ao teste tuberculínico .....	37
Níveis de IFN $\gamma$ em sobrenadantes de culturas estimuladas com SEB, PPD e PA .....	37
Análise de subpopulações de linfócitos T ativadas por SEB, PPD e peptídeos de ESAT-6 em CMS de pacientes com AR .....	40
Pacientes positivos e negativos para o teste tuberculínico podem ter frequências semelhantes de linfócitos T CD4+ e CD8+, não-produtores de IFN $\gamma$ , ativados por antígenos de <i>M. tuberculosis</i> .....	41
Linfócitos T produtores de IFN $\gamma$ , específicos para PPD e antígenos de <i>M. tuberculosis</i> estão presentes no sangue de pacientes com AR mesmo com teste cutâneo negativo para PPD .....	46
<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
Fatores associados à negatividade da resposta <i>in vivo</i> ao PPD em pacientes com AR previamente expostos ao <i>M. tuberculosis</i> .....	53
Linfócitos T produtores de IFN $\gamma$ em resposta a PPD e PA foram identificados em pacientes com testes cutâneos positivos e negativos .....	55
PPD cutâneo x análise antígeno-específica <i>in vitro</i> .....	55
<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	61
Proposta de via inflamatória alternativa .....	63
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65



LEITURA RELACIONADA	76
ANEXOS	77
Protocolo experimental I .....	78
Protocolo experimental II .....	81
Análise do ensaio de Citometria de Fluxo – representativa (P8) .....	83
Tabelas com as porcentagens obtidas nos ensaios de Citometria de Fluxo .....	85
Tabelas com os valores de IFN $\gamma$ obtidos nos ensaios de ELISA .....	88
Peptídeos sintéticos de ESAT-6 (PA) .....	89
Questionário Artrite Reumatóide – Tuberculose .....	90
Dados clínicos dos pacientes do estudo .....	91
Termo de Consentimento .....	93
Lista de soluções e reagentes .....	95
Artigo: Brazilian Rheumatoid Arthritis Patients negative to Tuberculin Skin Test respond <i>in vitro</i> to PPD and to ESAT-6-derived Peptides .....	98

## RESUMO

---

Introdução. A terapêutica de pacientes com artrite reumatóide (AR) pode utilizar os inibidores do TNF $\alpha$  que, dentre seus principais para-efeitos, aumentam o risco de tuberculose (Tb). Dados recentes mostram que o PPD cutâneo (TST), utilizado na avaliação de exposição ao *Mycobacterium tuberculosis*, é mais freqüentemente negativo ou menos intenso em pacientes com AR, quando comparados com indivíduos sem AR. Objetivo. Investigar parâmetros de resposta imune *in vitro* a PPD e peptídeos sintéticos correspondentes à proteína ESAT-6, específica para *M. tuberculosis*, em pacientes com AR, em avaliação para uso de imunobiológicos. Material e Métodos. Células mononucleares de sangue de 08 pacientes com AR do HUPE/UERJ foram isoladas, e estimuladas *in vitro* com PPD e ESAT-6. Foram avaliados os níveis de IFN $\gamma$  (ELISA) e as freqüências de linfócitos T produtores e não-produtores de IFN $\gamma$  específicos para estes antígenos (citometria de fluxo), em pacientes de AR positivos (n=2) e negativos (n=6) para TST. Resultados. A maioria dos pacientes com TST negativo respondeu ao PPD *in vitro*, produzindo IFN $\gamma$  em níveis equivalentes aos dos pacientes reatores ao TST. Não houve equivalência da resposta *in vitro* a peptídeos de ESAT-6 com a resposta *in vivo* ou *in vitro* ao PPD, sugerindo que a exposição a outras micobactérias também pode estar relacionada com TST positivo nestes pacientes. As freqüências observadas de linfócitos T específicos para ESAT-6 e PPD mostraram que as populações de linfócitos T de memória específicos para estes antígenos podem ter dimensões equivalentes em pacientes com AR reatores e não-reatores no TST. Assim, a negatividade ao teste está provavelmente associada à redução na capacidade destas células de migrar para a pele e/ou de induzir resposta inflamatória cutânea em resposta ao PPD. Conclusão. Estes dados questionam a relevância do teste cutâneo para identificar Tb latente em pacientes com AR, especialmente em regiões de alta endemicidade.

## **ABSTRACT**

---

The treatment of rheumatoid arthritis (RA) is increasingly relying upon the use of biological response modifiers (BRM), but specially in the case of TNF $\alpha$  ligands, there is an important increase in the risk of inducing the evolution of latent tuberculosis (Tb) infection to active pulmonary disease. Recently, Peruvian investigators found that tuberculin skin test (PPD) was negative, or had a reduced intensity, much more frequently in RA patients than in the non-RA counterparts. In order to investigate the mechanisms underlying unresponsiveness to PPD in RA patients, this work evaluated *in vitro* immune response parameters to PPD and synthetic peptides (PA) derived from ESAT-6, a *Mycobacterium tuberculosis*-specific protein, in RA patients being considered for BRM treatment, under follow-up at the State University of Rio de Janeiro Hospital. Mononuclear leukocytes isolated from blood of 08 RA patients were cultured in the presence of PPD and PA. IFN $\gamma$  levels in culture supernatants were determined by ELISA, and the frequencies of IFN $\gamma$ -producing and non-producing T lymphocytes, present in the blood were analyzed by flow cytometry in PPD-positive (n=2) and PPD-negative (n=6) RA cases. The majority of The PPD-negative RA patients here investigated responded *in vitro* to PPD, and IFN $\gamma$  levels in PPD-stimulated cultures of PPD-positive and negative individuals were comparable. *In vitro* responsiveness to the ESAT-6-derived synthetic peptides did not parallel the responses *in vivo* or *in vitro* to PPD. This observation suggests that exposure to other mycobacteria besides *M. tuberculosis* can also be related to the skin tests positive for PPD in our RA patients. The observed frequencies of T lymphocytes specific for ESAT-6 and PPD demonstrate that the pools of memory T cells responsive to mycobacterial antigens can have equivalent dimensions in RA patients with positive and negative tuberculin skin tests. Thus, the negativity of the test is more likely associated to reduced capacity of the PPD-specific T cells for homing to the skin and/or for inducing cutaneous inflammation in response to PPD. Taken together, our observations put in question the relevance of the tuberculin skin test for identifying latent Tb in RA, specially in patients from endemic regions for Tb.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Abs	Absorbância
Abs.m	Absorbância média
APC	Allophycocyanin/ Alofococianina
AR	Artrite Reumatóide
AR-SKG	Modelo murino de artrite espontânea autoimune (camundongos do tipo SKG)
“B”	Coeficiente linear da equação de regressão linear: $Ax + B$
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell Leukemia/Lymphoma 2/ Leucemia/linfoma de linfócito B, tipo 2
BK	Bacilo de Koch
BSA	Bovine Serum Albumin/ Albumina de Soro Bovino
CD4, 8, 25, 28, 69	Cluster of differentiation/ Agrupamento de diferenciação 4, 8, 25, 28, 69
ce	Co-estímulo
CF	Citometria de Fluxo
CFP-10	Culture Filtrate Protein-10/ Proteína 10 de filtrado de cultura
CMS	Célula Mononuclear de Sangue
CpG	Regiões de DNA ricas em C e G
Cy	CyChrome/ CyCromo
DC	Dendritic Cell/ Célula Dendrítica
DMARD	Disease Modifier Anti-Rheumatic Drug/ Droga Anti-reumática Modificadora de Doença
EDTA	Ethilenodiaminotetracetic Acid/ Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay/ Imuno-ensaio enzimático
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot/ Imuno-sinal enzimático
ESAT-6	6 kDa early-secreted antigenic target/ Antígenos secretados precocemente (6 kDa) por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate/ Isotiocianato de Fluoresceína
HIV	Human Immunodeficiency Virus / Vírus da imunodeficiência humana

HLA	Human Leukocyte Antigen / Antígeno leucocitário humano
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFN $\gamma$	Interferon - gama
Ig G, M	Imunoglobulina G,M
IL-1, 4, 6, 12, 17 e 23	Interleucina 1, 4, 6, 12, 17 e 23
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCC	Meio de Cultura Completo
NOD-SCID	Nonobese Diabetes – Severe Combined Immunodeficiency/ Diabete não relacionada à obesidade – Imunodeficiência Grave Combinada
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Mix of ESAT-6 Peptide 20 Amino Acid Sequences/ Mistura de peptídeos sintéticos (seqüência de 20 aminoácidos) da proteína ESAT-6
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns/ Padrões moleculares associados a patógenos
P1, 2 ... 8	Paciente 1, 2 ... 8
PBS	Phosphate Buffer Saline/ Tampão salina fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Reação da cadeia de polimerase
PE	Phycocerythrin/ Ficoeritrina
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex/ Complexo Proteína-Clorofila-Peridina
PPD	Purified Protein Derivative/ Proteína purificada derivada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
R1, 2 ou 3	Região 1, 2 ou 3
RIP	Rifampicina, Isoniazida e Pirazinamida
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SE	Sem Estímulo
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SFB	Soro Fetal Bovino

SN	Sobrenadantes
SP	Solução de Permeabilização
Tb	Tuberculose
TCR	T Cell Receptor/ Receptor de Linfócito T
Th1 ou Th <sub>IL-17</sub>	Linfócito T Helper 1 ou IL-17
TLR 2 ou 4	Toll Like Receptor/ Receptor tipo toll, 2 ou 4
TNF $\alpha$	Tumour Necrosis Factor/ Fator de Necrose Tumoral - alfa
UCF	Unidade de Citometria de Fluxo
ZAP-70	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa/ Proteína quinase de 70 kDa associada a cadeia zeta do TCR

## ***INTRODUÇÃO***

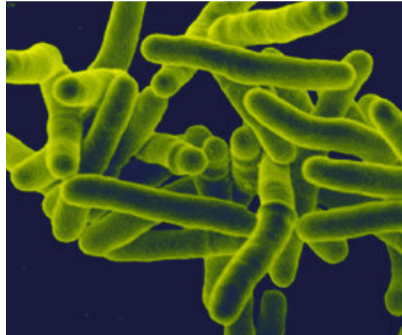
---

## A Tuberculose

A Tuberculose (Tb) é uma doença infecto-contagiosa que re-emergiu como problema de saúde pública há mais de 10 anos, atingindo inclusive populações distantes, como esquimós e tribos amazônicas (Mandell *et al.*, 2004) e levando a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, a declará-la uma “emergência global” (OMS, 2005).

### - Etiologia:

A Tb tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que foi isolado pelo pesquisador alemão Robert Koch em 1882. Por conta disso, este agente também é conhecido como Bacilo de Koch (BK) (por Kaufmann, 2003; Taylor *et al.*, 2003).



Microscopia eletrônica do Bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*).  
Fonte: [www.niaid.nih.gov](http://www.niaid.nih.gov)  
17/01/2006

### - Transmissão e mecanismo de infecção:

A principal via de transmissão é por inalação de partículas contendo o agente: após a tosse ou espirro da pessoa com doença ativa, os aerossóis ficam em suspensão no ar como gotículas microscópicas, chamadas de gotículas de Pflugge (Bass *et al.*, 1990; Costa, 1998).



Uma vez no organismo, o *M. tuberculosis* se estabelece no trato respiratório e induz ativação de macrófagos alveolares, que vão inicialmente controlar o crescimento do bacilo. Por volta de 6 semanas após a infecção, linfócitos T CD4+, especificamente ativados, vão para a área pulmonar e produzem IFN $\gamma$ , citocina crítica na indução de ativação de novos macrófagos, e apresentam função efetora contra o patógeno fagocitado. Os linfócitos T CD8+ também produzem IFN $\gamma$  e atuam na eliminação de macrófagos infectados. O TNF $\alpha$ , produzido tanto por linfócitos quanto por macrófagos ativados tem papel essencial na manutenção do ambiente inflamatório. A continuidade da ação conjunta dos linfócitos T, macrófagos e citocinas forma o quadro anátomo-patológico característico da Tb: a formação de granuloma e necrose caseosa central, seguida de fibrose (Kaufmann, 2001; Abbas & Lichtman, 2003; North & Jung, 2004; Robbins & Cotran, 2004; Rook *et al.*, 2005).

Sendo assim, a lesão granulomatosa característica da Tb tem função primordial no controle do bacilo e é um resultado direto da ação conjunta dos sistemas imune inato e celular específico, do próprio paciente. Mesmo aparentemente estável, a infecção latente pelo *M. tuberculosis* pode ser re-ativada a qualquer momento, desde que o organismo do paciente proporcione condições para tal.

#### - Tipos de Tuberculose:

A Tb pulmonar assintomática é chamada de latente e apenas se converte em infecção ativa (doença) em condições específicas de saúde e predisposição do indivíduo. Em geral, de 5 a 10% dos indivíduos expostos desenvolvem a doença mais tarde (Rook *et al.*, 2005).

Secundariamente ao processo pulmonar, o bacilo pode adentrar os sistemas linfático e sanguíneo e se estabelecer em outros órgãos do corpo, criando as formas extra-pulmonares de Tb, das quais as mais freqüentes são a cerebral, pleural, a gênito-urinária e a osteo-articular (Mandell *et al.*, 2004). Considera-se que as formas extra-pulmonares não oferecem risco significativo de contaminação (Golden & Vikram, 2005).

- Diagnóstico:

O diagnóstico-base da Tb latente é feito através da prova tuberculínica, através da aplicação cutânea do PPD RT23 (*purified protein derived* de *M. tuberculosis*) e da avaliação do histórico clínico do paciente (Costa, 1998; Furst *et al.*, 2002; Whalen, 2005). Caso os resultados dos exames acima sejam sugestivos, faz-se a radiografia de tórax, visando encontrar lesões associadas à doença,



Leitura de teste tuberculínico (PPD RT23).

Fonte: <http://www.kcom.edu>  
20/12/2005

Outros testes já foram padronizados para diagnóstico de Tb latente, desenvolvidos com base em métodos já estabelecidos como PCR, ELISA e ELISPOT (Pala *et al.*, 2000; Doherty *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005) e usando as

proteínas ESAT-6 e/ou CFP-10, específicas de *M. tuberculosis* (Hill *et al.*, 2005; Renshaw *et al.*, 2005).

- Sintomas:

Considera-se a Tb ativa de fácil detecção por apresentar sintomas claros, como tosse intensa com expectoração por mais de três semanas, febre vespertina (por vezes acompanhada de suores intensos), perda de apetite e presença de sangue no escarro (hemoptise). A Tb latente, por ser assintomática, exige uma investigação mais rigorosa do histórico clínico do paciente (Bass *et al.*, 1990; Robbins & Cotran, 2004).

Em geral, a equipe médica investiga uma possível infecção por *M.tuberculosis* em indivíduos sabidamente imuno-comprometidos, como os HIV-positivos e usuários de agentes imunossupressores e anti-inflamatórios, como pacientes transplantados e com Artrite Reumatóide, por sua já conhecida susceptibilidade imunológica (Mangini & Melo, 2003; Aaron *et al.*, 2004).

Em muitos países existem programas para detecção em massa de infecção latente por *M.tuberculosis*, seguida de tratamento, na tentativa de controle epidemiológico da Tb (Baltussen *et al.*, 2006).

- Tratamento:

Até o início da década de 40, a Tb era responsável por 1 a cada 4 óbitos registrados, pois não havia qualquer tratamento para a doença. Apenas em 1944, foi descoberta a estreptomicina, primeiro medicamento capaz de combater o *M.tuberculosis* (Bass *et al.*, 1990).

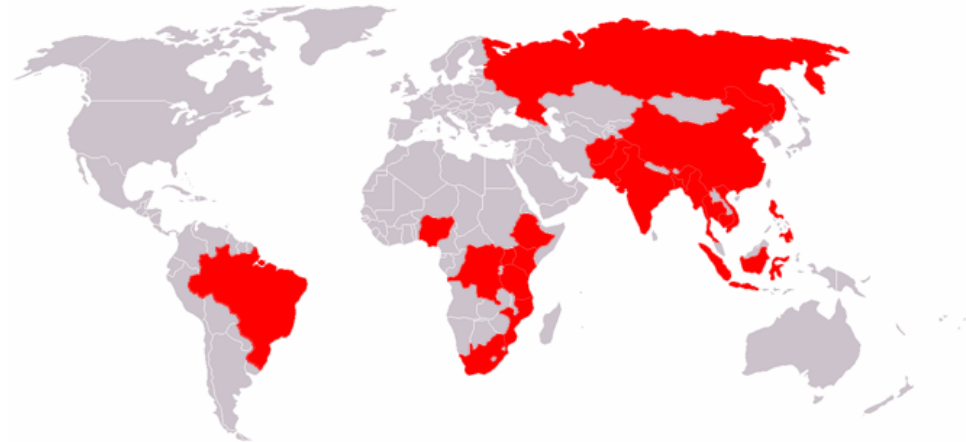
Atualmente, o esquema terapêutico mais utilizado no tratamento da Tb é o RIP (rifampicina, isoniazida e pirazinamida), com duração de seis meses (Blumberg *et al.*, 2005). Um problema freqüente é o abandono do tratamento pelos pacientes. Isto normalmente ocorre pela amenização dos sintomas da doença após 15 dias de tratamento, dando a falsa impressão de cura. A interrupção precoce do uso da medicação pode levar à seleção de *M.tuberculosis* resistentes aos medicamentos atualmente disponíveis, fato que gera a disseminação de bactérias cada vez mais virulentas (Blumberg *et al.*, 2005; Rook *et al.*, 2005).

- Prevenção:

A prevenção da Tb é feita pela vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) obtida pela atenuação em laboratório do *Mycobacterium bovis*. O BCG é capaz de induzir a resistência no indivíduo sem transmitir doença. A aplicação da vacina é feita por via intradérmica e indicada para o primeiro mês de vida, porém não fornece proteção duradoura (Mandell *et al.*, 2004; Rook *et al.*, 2005).

- Epidemiologia:

O quadro epidemiológico mundial da Tb é motivo de alerta. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) do ano de 2004 mostram que, neste ano, ocorreram quase 9 milhões de casos de Tb ativa em todo o mundo, levando ao número alarmante de 2,6 milhões de mortes (Blumberg *et al.*, 2005; OMS, 2005; Renshaw *et al.*, 2005).



80% dos casos de tuberculose no mundo estão concentrados nos países assinalados.  
Fonte: Wikipédia/OMS, <http://www.wikipedia.org> 13/01/2006

A Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro registrou, em 2003, 15 mil novos casos de Tb (casos notificados) no município do Rio de Janeiro, chegando a uma taxa de incidência de 87,5 casos por 100 mil habitantes. Do grupo de casos já estabelecidos, mais de 2 mil pacientes simplesmente abandonaram o tratamento (PCT-SES/RJ, 2005).

A alta incidência da doença, geralmente, está associada ao seu caráter oportunista, a diferenças inter-pessoais, como susceptibilidade imunológica momentânea e a uma possível predisposição genética que podem estar relacionados ao controle individual do desenvolvimento da doença (Mangini & Melo, 2003; Aaron *et al.*, 2004, Robbins & Cotran, 2004).

- Tuberculose oportunista:

O aumento de susceptibilidade a infecções já é característico de algumas doenças, especialmente das doenças auto-imunes, como podemos comprovar em pacientes com Artrite Reumatóide (Klippel & Dieppe, 2000). Porém, o uso de

novas terapias anti-citocinas pró-inflamatórias nestes pacientes pode agravar o quadro de vulnerabilidade, momento propício para a infecção pelo *M. tuberculosis* se estabelecer.

O aumento de casos de Tb em pacientes com Artrite Reumatóide tem sido registrado mundialmente e requer atenção especial no Brasil, local onde a Tb é um dos maiores problemas de saúde pública e o novo esquema terapêutico anti-citocina está em plena fase de estabelecimento (Mangini & Melo, 2003; Yoshinaga *et al.*, 2004).

### **A Artrite Reumatóide**

Os distúrbios reumáticos são considerados como uma das principais categorias de doenças incapacitantes existentes. O primeiro caso de distúrbio reumático com sintomas similares aos da Artrite Reumatóide (AR) foi publicado em 1800, porém apenas em 1859 o termo “Artrite Reumatóide” começou a ser utilizado. Na época, incluía um grupo de distúrbios que já não fazem mais parte da definição atual de AR, como a poliartrite inflamatória e a osteoartrite poliarticular. Nos anos de 1922 e 1958, muitos distúrbios não relacionados a AR foram excluídos de sua definição, porém sua real caracterização é um processo contínuo até os dias atuais (Gallin & Snyderman, 1999; Klippel & Dieppe, 2000).

A AR é uma doença inflamatória progressiva e crônica, que atinge principalmente mulheres, entre 35 e 60 anos, mas também jovens e homens adultos, os últimos em menor proporção (Mangini & Melo, 2003). Estudos recentes estimam que a prevalência da AR no Brasil é de 0,5 a 1% (Senna *et al.*, 2004), acompanhando a prevalência mundial de 0,8% a 1% (<http://www.arthritis.org> ; Goldblatt & Isenberg, 2005).

- Etiologia:

A origem da doença é desconhecida. Existem estudos voltados para a descoberta de um possível agente etiológico inicial, do tipo infeccioso ou farmacológico, por exemplo (Carty *et al.*, 2004).

Investigações associando AR com fenótipo HLA de classe II, mostram que HLA-DR está relacionado à AR. Polimorfismos nas posições 70/71/74 do gen HLA-DRB1 (alelos \*0401, \*0404 e \*0408) estão associados a AR, e HLA-DR4 está relacionado com a gravidade da doença. Contudo, o papel destes genes no desencadeamento da AR é incerto (Klippel & Dieppe, 2000; <http://www.arthritis.org/>).

Fatores hormonais também se mostram associados à progressão da doença. A diferença de prevalência da AR entre mulheres e homens poderia ser explicada pela participação de hormônios sexuais no controle da doença. Dados clínicos mostram que o uso de anticoncepcionais ameniza e retarda aparecimento dos sintomas da AR, mostrando sua clara influência na doença (Gallin & Snyderman, 1999).

Outros estudos propõem que, indivíduos idosos (senescentes) apresentam uma susceptibilidade natural para distúrbios auto-imunes e os linfócitos T dos pacientes com AR apresentam um perfil senescente precoce, por erosão acelerada dos telômeros (observada tanto em linfócitos T virgens quanto nos de memória), levando a um possível desencadeamento de resposta auto-imune sem, necessariamente, o envolvimento de um agente etiológico (fator que poderia explicar a alta incidência de AR em indivíduos da segunda idade).

O modelo de artrite espontânea auto-imune em camundongos SKG (AR-SKG) permite esclarecer diversos aspectos ligados a esta doença, com grande

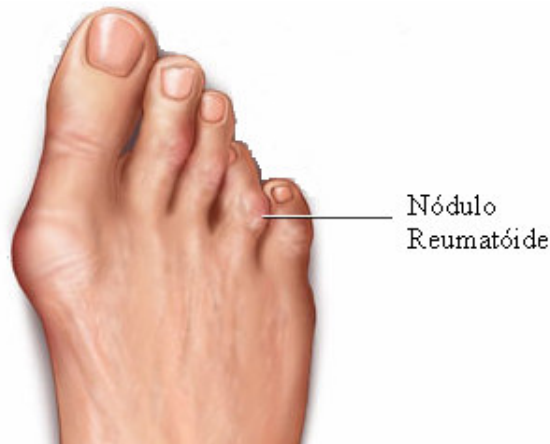
probabilidade de aplicação à AR humana (Hata *et al.*, 2004). Nestes animais, uma mutação na proteína de 70 kDa associada a cadeia zeta (ZAP-70), altera o limiar de ativação de linfócitos T e, devido a isto, a seleção negativa tímica falha, e surgem linfócitos T CD4 auto-reativos que induzem artrite auto-imune espontânea. A doença pode ser induzida por transferência de linfócitos T e exibe as características básicas da AR humana. Além do papel fundamental destes linfócitos T, a doença exige ainda a presença de IL-6 para ocorrer. A evolução é mais branda em camundongos geneticamente deficientes para TNF $\alpha$ , e mais grave nos deficientes em IL-10. Outro fato digno de nota na AR-SKG é que há necessidade de envelhecimento do camundongo para que as lesões inflamatórias da doença se manifestem (Hata *et al.*, 2004).

Independente da origem, existe a certeza de que o papel da imunidade é crucial na progressão da doença, considerando que a resposta na AR é continuada contra antígenos próprios expressos na articulação (Klippel & Dieppe, 2000; Weyand *et al.*, 2003; Goronzy & Weyand, 2005).

- Sintomas:

A AR tem como seus principais focos de manifestação as articulações sinoviais periféricas, locais onde se estabelece geralmente de forma simétrica. Porém, ela também pode desenvolver um quadro sistêmico, atingindo vários tecidos e órgãos, como pele, vasos sanguíneos, pulmões, olhos, músculos e coração (Klippel & Dieppe, 2000; <http://www.arthritis.org/>). Em grande parte dos casos, manifestações cutâneas, como nódulos, vasculite e dermatite granulomatosa, são observados (Sayah & English 3rd, 2005).





Fonte: WebMD, <http://www.webmd.com>  
13/01/2006

Os primeiros sintomas de AR apresentam variações inter-pessoais, porém, em geral, iniciam-se em pequenas articulações, como as dos dedos, mãos e punhos, já apresentando caráter simétrico. Outros sintomas associados observados são fadiga, fraqueza, anemia, secura bucal, dor muscular associada à inércia, dormência e formigamento de mãos e pés, perda de apetite e peso. O avanço da doença é caracterizado pela deterioração de tendões, cartilagem e erosão óssea das articulações, gerando deformidades e influenciando negativamente na qualidade de vida desses pacientes (Klippel & Dieppe, 2000, Robbins & Cotran, 2004).



Alterações articulares típicas de Artrite Reumatóide em estágio mais avançado, com erosão e rigidez articular. Fonte: <http://www.csmc.edu>  
13/01/2006

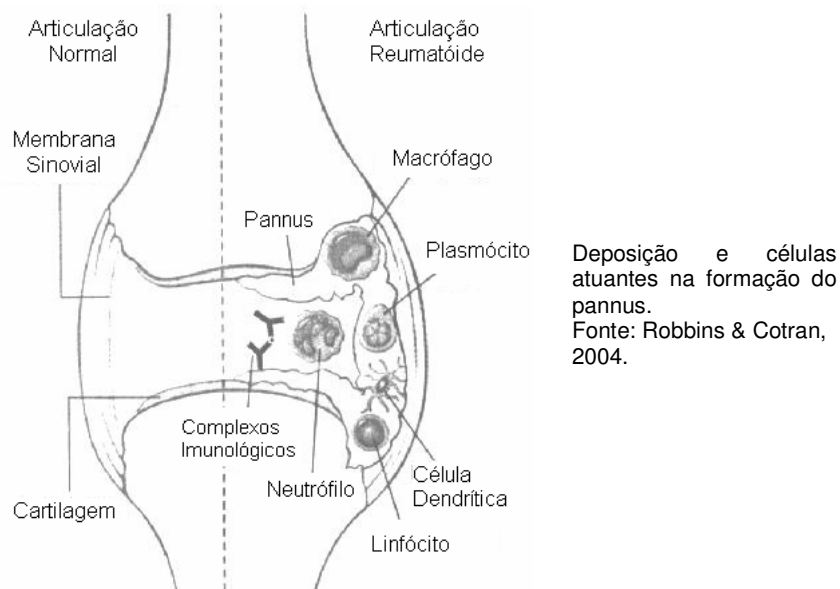
- Imunopatologia:

O aspecto imunopatológico da AR na articulação é caracterizado pela ação conjunta dos sistemas imune celular específico e inato. Acredita-se que a imunidade celular na AR pode atuar por conta do reconhecimento de auto-antígenos, como colágeno do tipo II, peptidoglicanos (polímeros de glicídios unidos por ligações cruzadas de aminoácidos), imunoglobulinas ou proteínas de choque-térmico, porém este mecanismo precisa de maiores esclarecimentos (Klippel & Dieppe, 2000).

Sendo assim, o processo se inicia com um desencadeador desconhecido induzindo a infiltração de macrófagos, plasmócitos, células dendríticas e linfócitos T na sinóvia. Os linfócitos formam folículos linfóides e os macrófagos com células dendríticas vão criar um ambiente inflamatório na sinóvia. Os linfócitos T CD4+ infiltrados, em sua grande maioria com fenótipo de memória (CD45RO+), vão produzir IFN $\gamma$  ativando os macrófagos e as células dendríticas para que estes comecem a produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 e IL-1, cruciais na ativação de células inflamatórias locais e manutenção de seus próprios estados de ativação (Gallin & Snyderman, 1999; Weynad *et al.*, 2003; Abbas & Lichtman, 2003). O quadro inflamatório neste estágio mostra-se exacerbado.

Alguns estudos propõem que o descontrole do processo inflamatório na articulação também poderia ser explicado por um defeito de atividade supressora de linfócitos T CD4+CD25+ (Kohm *et al.*, 2002). Em seguida, ocorre um aumento da vascularização local, com grande infiltração de neutrófilos e longe dos vasos sanguíneos localizam-se agregados de linfócitos T CD8+ supressores. Os complexos formados pelos linfócitos T, macrófagos e plasmócitos são

gradualmente envolvidos por fibrina, formando um tecido de granulação chamado de pannus, que vai se depositar na margem da cartilagem articular, degradando-a. Após destruir a cartilagem, o pannus avança até a estrutura óssea, erodindo-a (Klippel & Dieppe, 2000; Robbins & Cotran, 2004).



Todo o processo de degradação estrutural, tanto cartilaginosa quanto óssea, ocorre por ação de metaloproteinases e collagenases produzidas pelos próprios macrófagos presentes no pannus, além de fibroblastos e condroblastos locais (Klippel & Dieppe, 2000; Robbins & Cotran, 2004).

O sistema imune humoral específico, através dos linfócitos B, também mostra sinais na AR, porém de forma periférica. Os pacientes freqüentemente apresentam auto-anticorpos, IgM e IgG, contra a porção Fc de suas próprias IgGs. Estes anticorpos são chamados de fatores reumatóides e são usados como um dos parâmetros no diagnóstico da doença (Gallin & Snyderman, 1999; Klippel & Dieppe, 2000).

- Diagnóstico:

O diagnóstico-base da AR é um processo que envolve tipos diferentes de avaliação, pois ainda não existe no mercado um exame único que seja capaz de diagnosticar a doença.

A avaliação do paciente começa por seu histórico familiar e médico, do qual informações quanto ao horário, gravidade, frequência e localização da dor sentida são de suma importância. Segue-se então um exame físico minucioso para detectar possível rigidez articular e manifestações periféricas de AR, como nódulos na pele ou problemas oculares. Os testes laboratoriais (como hemossedimentação, hemograma completo, dosagem de proteína C reativa e fator reumatóide) e as avaliações por imagem (como radiografia, ressonância magnética, densitometria óssea e ultra-som) fecham a avaliação médica (Klippel & Dieppe, 2000; Laurindo *et al.*, 2002).

Todos os resultados obtidos são avaliados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia, para classificação da doença (Arnett *et al.*, 1988).

- Tratamento e efeitos colaterais:

A melhor estratégia para controle da AR é o diagnóstico precoce da doença e o bom acompanhamento ambulatorial desses pacientes. Uma vez diagnosticada a doença, o tratamento deve ser iniciado imediatamente, objetivando a redução da dor, da inflamação, para evitar lesões irreversíveis e preservar a vida funcional do paciente.

O tratamento inicial da AR é feito com analgésicos, anti-inflamatórios (esteróides ou não), para reduzir a inflamação articular e a dor, e drogas anti-

reumáticas modificadoras da doença (DMARDs), que são medicamentos mais eficazes, porém sua atividade imunossupressora pode levar a efeitos colaterais bastante acentuados (Klippel & Dieppe, 2000; Abbas & Lichtman, 2003). Intervenções cirúrgicas só são indicadas para reparar lesões na estrutura articular ou nos tendões, não tendo qualquer função no controle das causas da doença em si (Laurindo *et al.*, 2002).

Atualmente, novas drogas anti-citocina, consideradas como drogas modificadoras de resposta biológica, estão sendo indicadas para pacientes que mesmo com uso dos tratamentos convencionais mantêm a doença em atividade (Laurindo *et al.*, 2002; Goldblatt & Isenberg, 2005). Estes medicamentos têm mostrado resultados animadores no controle da AR, porém doenças importantes, como linfoma (Balandraud *et al.*, 2005) e Tb (Gómez-Reino *et al.*, 2003; Mangini & Melo, 2003), estão surgindo como consequência de seu uso. Este tratamento está começando a ser difundido no Brasil, o que exige uma atenção especial do corpo médico e auxiliar sobre os efeitos colaterais destes medicamentos (Mangini & Melo, 2003).

### **A Tuberculose em pacientes com Artrite Reumatóide**

#### **- Terapias biológicas e Tb:**

Como brevemente comentado nos itens anteriores, as terapias biológicas, realizadas com drogas anti-IL1 e anti-TNF $\alpha$ , estão em uso crescente no mundo todo e seus bons resultados no tratamento da AR são uma realidade (Gómez-Reino *et al.*, 2003; Mangini & Melo, 2003). Dos medicamentos disponíveis no mercado, dois são anticorpos anti-TNF $\alpha$  (Infliximabe e Adalimumabe) e um apresenta-se como proteína solúvel (Etanercepte), mas todos se ligam ao TNF $\alpha$

solúvel, impedindo sua interação com seu receptor celular (Goldblatt & Isenberg, 2005). Uma das vias de atuação das drogas inibidoras de TNF $\alpha$  é a de indução do aumento da atividade funcional de linfócitos T CD4+CD25+, sub-população de caráter supressor que encontra-se reduzida numérica e funcionalmente nos pacientes com AR. O aumento de atividade das células CD4+CD25+, pelo uso do anti-TNF $\alpha$ , leva a um controle mais eficaz da proliferação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias, e redução de manifestações clínicas inflamatórias articulares, na AR (Ehrenstein *et al.*, 2004).

Porém, sabe-se que o uso da nova terapêutica anti-citocina, especialmente as drogas anti-TNF $\alpha$ , tem sido associado ao aumento da incidência de casos de Tb nestes pacientes. A inibição do TNF $\alpha$  reduz a resistência do organismo a patógenos intracelulares, pois ele é necessário para a manutenção da ativação de macrófagos e do ambiente inflamatório, deixando o paciente mais susceptível a novas infecções ou ao início da atividade de uma infecção latente (Gómez-Reino *et al.*, 2003; Abbas & Lichtman, 2003; Mangini & Melo; 2003).

Estudos mostram que o quadro clínico da Tb é mais grave em indivíduos usuários de inibidores de TNF $\alpha$  do que o observado nos não-usuários destes medicamentos (Yoshinaga *et al.*, 2004). Quando o anti-TNF $\alpha$  é usado em associação com outros medicamentos, como imunossuppressores, a progressão da Tb torna-se ainda mais grave (Hernandez-Cruz *et al.*, 1999; Hochberg *et al.*, 2005).

Em todo o mundo, a indicação de uso da terapia anti-citocina para o paciente de AR é uma questão a ser analisada criteriosamente. O corpo clínico solicita exames para detecção de infecção ativa ou latente por *M. tuberculosis*, para que a estratégia de tratamento seja montada previamente, ou tratando

preventivamente o paciente com indício de infecção antes do uso do anti-TNF $\alpha$  ou indicando outra terapia, caso seja possível (Gómez-Reino *et al.*, 2003).

Os modelos murinos atualmente existentes de Tb experimental em camundongos geneticamente deficientes para TNF, mostram nesses animais uma produção reduzida de citocinas, e, em conseqüência, menos ativação e migração de células imunocompetentes para os pulmões. Essas alterações são propostas como a causa fundamental da evolução da Tb latente para infecção ativa quando a atividade funcional de TNF é inibida ou ausente (Botha *et al.*, 2003).

No Brasil, o uso dos inibidores de TNF $\alpha$  está em crescimento. Este fato merece atenção, pois a Tb é um problema de saúde pública em nosso país e o uso da terapêutica anti-citocina em pacientes com distúrbios auto-imunes, especialmente os com AR, poderá ter papel importante no aumento da incidência desta doença no país (Mangini & Melo, 2003). Sendo assim, os reumatologistas brasileiros, com base nos critérios elaborados pela Sociedade Brasileira de Reumatologia, estão realizando exames para avaliação de infecção por *M. tuberculosis* em pacientes do Brasil antes do uso da terapia anti-citocina (Laurindo *et al.*, 2002).

Além dos parâmetros clínicos de avaliação, torna-se de grande relevância o estudo laboratorial da resposta imune celular de pacientes com AR a antígenos de *M.tuberculosis*, previamente ao uso da terapia anti-citocina. Estes dados devem permitir uma melhor compreensão das populações de linfócitos T envolvidas na resposta ao *M. tuberculosis*, como elas atuam no controle da infecção latente e as citocinas envolvidas neste processo. No futuro, estes dados podem servir de base para um teste diagnóstico para infecção por *M. tuberculosis* em pacientes com AR. As estratégias experimentais usadas permitiram a

avaliação de linfócitos T antígeno-específicos presentes no sangue, estimando a possibilidade destes indivíduos já terem entrado em contato com o *M.tuberculosis* anteriormente, assim como a secreção de IFN $\gamma$ , citocina crítica no controle da infecção por *M.tuberculosis* (Pai, 2005).

- Sensibilidade na detecção de resposta ao *M. tuberculosis*:

O teste tuberculínico é o mais usado para detecção do contato prévio com o *M. tuberculosis* e consiste na aplicação cutânea do PPD, que é um preparado de proteínas purificadas deste bacilo. Porém, este teste perde em especificidade, pois outros tipos de micobactérias também podem apresentar algumas proteínas do preparado (Lee & Holzman, 2002; Whalen, 2005).

Como dito anteriormente, outros testes já foram padronizados para a detecção/diagnóstico mais confiável de infecção latente por *M. tuberculosis*, através de métodos como PCR, importante para medir de forma quantitativa níveis de RNAm relevante, ELISA, capaz de medir quantidades de proteínas secretadas e ELISPOT, eficiente em estimar a frequência de células produtoras de citocinas relevantes (Pala *et al.*, 2000; Doherty *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005). Estes métodos usam para detecção as proteínas ESAT-6 e/ou CFP-10 (Renshaw *et al.*, 2005). Estas proteínas específicas de *M. tuberculosis* aparentemente estão envolvidas com a virulência deste bacilo e já estão disponíveis para testes *in vitro* em geral (Hill *et al.*, 2005; Renshaw *et al.*, 2005).

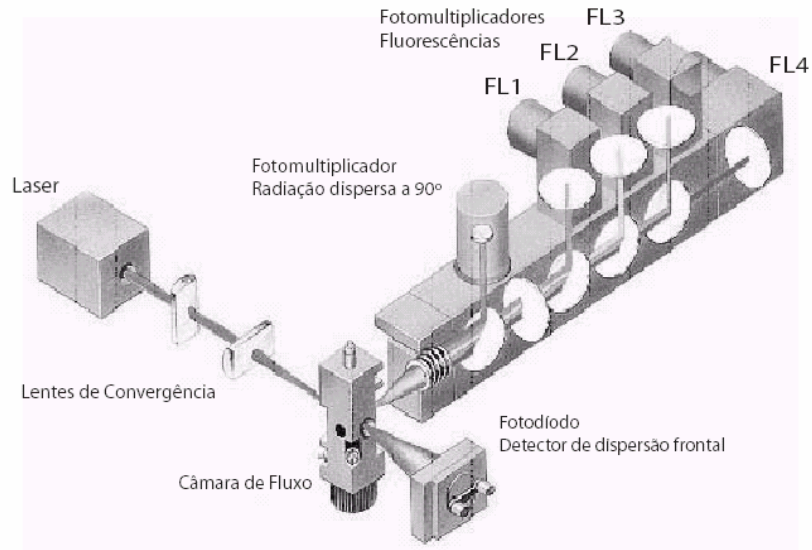
A Citometria de Fluxo (CF) é um método de grande eficiência e sensibilidade que está começando a ser utilizado com finalidade diagnóstica em indivíduos nos quais a resposta em teste cutâneo está comprometida (renais crônicos, por exemplo) (Sester *et al.*, 2004).



Os primeiros citômetros de fluxo foram aprimorados com a colaboração do grupo de Gucker e do Exército americano, durante a segunda grande guerra mundial, para a detecção de armas biológicas que usassem esporos bacterianos (Davey & Kell, 1996).

Desde então, a CF tem se desenvolvido e se estabelecido como uma das principais metodologias usadas na pesquisa imunológica e de diagnóstico, com grande contribuição do grupo de Leonard Herzenberg, da Universidade de Stanford/CA (Zola, 2000). Suas aplicações são inúmeras: análise de ciclo celular, fagocitose, imunofenotipagem de células tumorais, análise de DNA, detecção de células antígeno-específicas ou produtoras de citocinas, seleção física de populações celulares (sorting), biotecnologia, viabilidade celular, marcadores intracelulares, taxa de morte celular programada (apoptose) etc (Davey & Kell, 1996; Coligan, 1991; Robinson, 1997).

O sistema de funcionamento de um citômetro de fluxo consiste na passagem, por região sensível, de células que serão iluminadas individualmente por lasers, e os sinais resultantes da interação de cada célula com os feixes luminosos serão detectados por fotomultiplicadores, capazes de levar as informações para um sistema de computador, com programa próprio para armazenamento e análise dos dados associados a cada célula em uma dada população (Davey & Kell, 1996; Parks *et al.*, 1999).



Configuração interna de um Citômetro de Fluxo (Silva *et al.*, 2005, Boletim Biotecnologia).

A eficácia de protocolos de citometria para identificar células antígeno-específicas (Coligan, 1991; Robinson, 1997) faz desta técnica um importante recurso para a detecção e análise de linfócitos T *M. tuberculosis*-específicos em resposta ao estímulo de antígenos desta micobactéria. Estes protocolos podem avaliar as populações linfocitárias envolvidas na resposta ao bacilo, analisando a produção intracelular de citocinas e nível de expressão de marcadores de superfície, como os de ativação, por exemplo. A dosagem das citocinas secretadas durante as culturas celulares, por ensaios funcionais ou ELISA, podem complementar a avaliação citométrica.

- O PPD e a detecção de exposição ao *M. tuberculosis* em pacientes com AR:

O Peru e o Brasil concentram cerca de metade dos casos de Tb observados nas Américas. Desta forma, a avaliação do uso do teste cutâneo da tuberculina em pacientes com AR no Peru pode servir de base para a avaliação

deste procedimento em uma situação de alta endemicidade, que também ocorre em nosso país.

No Peru, Ponce de Leon e cols. (2005) compararam a positividade no teste cutâneo de 112 pacientes com AR com 96 controles aparentemente saudáveis. A área de endurecimento foi significativamente menor nos testes positivos de pacientes com AR em comparação com os controles (medianas de 4,5 mm para pacientes com AR versus 11,5 mm em controles). Da mesma forma, 70,6% dos pacientes com AR tiveram testes negativos vs. 26,0% dos controles. Fatores como idade, vacinação prévia com BCG ou uso de prednisona no tratamento não determinaram diferenças entre os pacientes (Ponce de Leon *et al.*, 2005). A menor intensidade de resposta cutânea ao PPD, e a frequência muito reduzida de testes positivos nos pacientes com AR, quando comparados com controles, submetidos a níveis comparáveis de exposição ao *M. tuberculosis*, são limitações importantes ao uso deste teste nestes pacientes.

A ausência de linfócitos T de memória específicos e/ou falha na resposta *in vivo* aos antígenos de *M. tuberculosis*, são explicações alternativas para os resultados observados no Peru. A avaliação *in vitro* da resposta imune ao PPD e a antígenos específicos de *M. tuberculosis*, pode definir qual das opções acima se aplica às observações de Ponce de Leon e cols (2005).

Os pacientes com AR em acompanhamento no Rio de Janeiro estão expostos ao *M. tuberculosis* em condições de endemicidade possivelmente semelhantes as do Peru. Para esclarecer estas observações, este trabalho avaliou, por citometria de fluxo, a presença de linfócitos T CD4+ e CD8+ de sangue periférico específicos para antígenos de *M. tuberculosis*. Foi também determinado nestas subpopulações de linfócitos T *M.tuberculosis*-específicos, a frequência de células

produtoras de IFN $\gamma$ . Estes linfócitos produtores de IFN $\gamma$  têm um papel importante na ativação de macrófagos para função efetora contra patógenos intracelulares. A secreção de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas também foi analisada por ELISA, para melhor avaliar a possível funcionalidade destas células no controle da Tb. Os dados *in vitro* foram comparados com o resultado do teste tuberculínico (aplicação de PPD RT23), usado como padrão para detecção de infecção latente ou ativa pelo *M.tuberculosis*.

## ***OBJETIVOS***

---

**Objetivo Geral:**

Analisar *in vitro* a resposta imune celular de pacientes com Artrite Reumatóide a antígenos de *M. tuberculosis*.

**Objetivos Específicos:**

- 1) Analisar por Citometria de Fluxo as freqüências de linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados (CD69+) e produtores de IFN $\gamma$  (CD69+/IFN $\gamma$ +) de pacientes com Artrite Reumatóide frente a PPD e a mistura de peptídeos sintéticos correspondentes a fragmentos de ESAT-6 (PA), proteína específica de *M. tuberculosis*;
- 2) Avaliar por ELISA os níveis de IFN $\gamma$  em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue destes pacientes após estímulo com PPD e PA;
- 3) Comparar a resposta destes pacientes a antígenos micobacterianos *in vitro* (linfócitos T antígeno-específicos e níveis de IFN $\gamma$ ) com a resposta *in vivo* do teste tuberculínico, usado no diagnóstico de Tuberculose.

***POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAIS E MÉTODOS***

---

#### *. POPULAÇÃO DE ESTUDO:*

Foram avaliados neste estudo 08 indivíduos (06 do sexo feminino e 02 do sexo masculino) com diagnóstico de AR (Classificação de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia; Arnett *et al.*, 1988), acompanhados pelo Setor de Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). Os pacientes com AR são candidatos ao uso do esquema terapêutico com drogas anti-TNF $\alpha$ .

Todos os indivíduos do estudo realizaram o teste tuberculínico para diagnóstico de possível infecção tuberculosa latente e também apresentam uma ficha de acompanhamento na qual constam dados como: nome completo, idade, sexo, tempo de diagnóstico da doença, exames já realizados, drogas em uso e possível histórico de Tb (vide ANEXOS, página 90).

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos e relevância desta pesquisa e aceitaram participar de forma voluntária. O termo de consentimento usado nesta pesquisa pode ser visto em detalhes em ANEXOS, na página 93.

#### *MATERIAIS E MÉTODOS:*

##### Teste tuberculínico – PPD RT23 cutâneo:

A aplicação do PPD (Purified Protein Derivated, PPD RT23, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca), utilizado de forma padrão na caracterização da infecção latente ou ativa por *M. tuberculosis*, foi avaliado pela medida do diâmetro da área de endureção, expresso em milímetros (Pinheiro, 2005): (a) *Não reator (NR)*: < 5 mm; (b) *Reator (R)*:  $\geq$  5 mm.



### Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS):

A amostra de sangue, colhida com anti-coagulante (Heparina, 20U/ml, Roche, São Paulo, SP, Brasil) e células mononucleares de sangue periférico (CMS) foram isoladas em gradiente de densidade com ficoll-hypaque (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, EUA), por centrifugação de 30 minutos, a 2000 RPM, temperatura ambiente e sem freio.

### Quantificação de subpopulações de linfócitos T específicos para antígenos micobacterianos, por citometria de fluxo:

As CMS isoladas em gradiente de densidade foram colocadas em cultura ( $5 \times 10^5$  células/ 200 $\mu$ L/ poço) por 6h (em estufa contendo 7,5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C) na presença ou não (SE) dos estímulos SEB (Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*, 1 $\mu$ g/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO EUA), PPD (10 $\mu$ g/mL, Mycos Research LLC, Loveland, CO, EUA) e PA (Mix of ESAT-6 Peptide Amino Acid Sequences, 9 $\mu$ g/mL, Centro Médico da Universidade de Leiden, Leiden, Holanda), com adição dos co-estímulos (ce, Anti-CD28, 1 $\mu$ g/mL e Anti-CD49d, 1 $\mu$ g/mL, BD-Pharmingen, San Jose, CA, EUA), para análise de citocinas intracelulares. Após cultura de 6h, a células foram coradas com 2,5 $\mu$ L anticorpos combinados dos kits Fastimmune™ (Intracellular Cytokine Detection Kit, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) para células CD4+ (anti-IFN $\gamma$  FITC/ anti-CD69 PE/ anti-CD4 PerCP.Cy) e para células CD8+ (anti-IFN $\gamma$  FITC/ anti-CD69 PE/ anti-CD8 PerCP.Cy/ anti-CD3 APC) e seus respectivos controles de isotipo:  $\gamma$ 2a FITC/  $\gamma$ 1 PE/ anti-CD4 PerCP.Cy e  $\gamma$ 2a FITC/  $\gamma$ 1 PE/ anti-CD8 PerCP.Cy/ anti-CD3 APC (BD Biosciences). Com o fim da etapa de coloração, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 1% (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemanha) e analisadas em

citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), na Unidade de Citometria de Fluxo (UCF) da FCM/UERJ (Vide ANEXO para detalhes, protocolo experimental I). As frequências de linfócitos T positivos para um dado estímulo (F) foram calculadas por subtração dos valores obtidos nos pontos corados com anticorpos irrelevantes de mesmo isotipo (Iso), dos pontos corados com anticorpos de especificidades desejadas (Esp), ou seja,  $F\% = \text{Esp}\% - \text{Iso}\%$ .

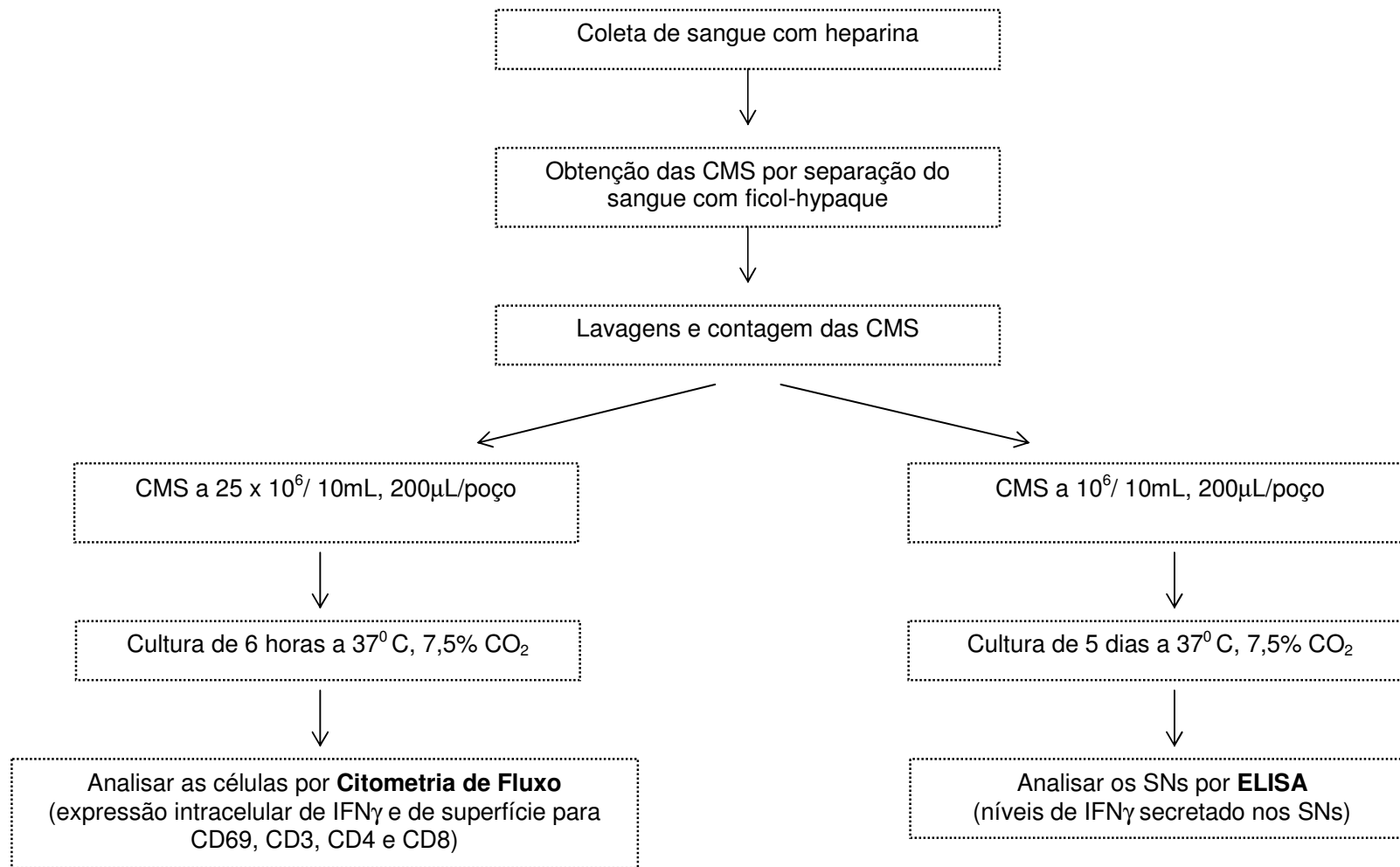
#### Dosagem de IFN $\gamma$ nos sobrenadantes de culturas por ELISA

As CMS obtidas por gradiente de densidade de ficoll-hypaque (Amersham Biosciences) foram centrifugadas em PBS (Tampão salina fosfato, pH 7,4) com 1% de SFB (Soro Fetal Bovino, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), ressuspensas em RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e colocadas em cultura ( $1 \times 10^5$  células/ 200 $\mu$ L/ poço) por 5 dias (em estufa de contendo 7,5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C) na presença ou não (SE) dos estímulos SEB (1 $\mu$ g/mL, Sigma Chemical Co.), PPD (10 $\mu$ g/mL, Mycos LLC) e PA (9 $\mu$ g/mL, Centro Médico da Universidade de Leiden), para obtenção dos sobrenadantes (SNs) (Vide ANEXO para detalhes, protocolo experimental I). Os SNs foram incubados por 2 horas em placa de fundo reto (Corning, NY, EUA) previamente tratada com anticorpo de captura anti-IFN $\gamma$  humano (4 $\mu$ g/mL, BD Pharmingen). A determinação dos níveis de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura foi feita a partir de curva padrão com IFN $\gamma$  recombinante (BD Pharmingen), com pontos nas concentrações de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 pg/mL. Após as etapas de lavagem (tampão de lavagem: PBS + 0,05% Tween 20, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), as amostras foram incubadas por 1 hora com anticorpo de detecção anti-IFN $\gamma$  humano biotilado (100ng/mL, BD Pharmingen). Seguiram-se lavagens com

tampão de lavagem e marcação, por meia hora, com Estreptavidina - peroxidase (HRP) (diluída 1000x do estoque, BD Pharmingen). Após subseqüentes lavagens, foi adicionado, por 5 minutos, substrato TMB (1:2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Tetrametilbenzidina, BD Pharmingen), seguido de adição de ácido sulfúrico 2,5N (Vetec, Taboão da Serra, SP, Brasil), para interromper a reação (Vide ANEXO para detalhes, protocolo experimental II). Os resultados foram obtidos em leitora de placas de ELISA Elix 800 (BioTek, Vermont, EUA), utilizando filtro de 450nm. A concentração de IFN $\gamma$  nos SNs foi calculada através da equação: [ ] pg/mL = Abs (média)/ B (coeficiente linear obtido da regressão linear da curva padrão). O *cut-off* (ponto de corte) de positividade foi de 125pg/mL.

#### Análise gráfica dos dados:

Os dados de aquisição das amostras em Citômetro de Fluxo foram obtidos no programa CellQuest Pro (BD Biosciences, EUA). Os gráficos de espalhamento (dot plots) ilustrados na figura 2, bem como a análise representativa em anexo, foram elaborados no programa WinMDI 2.8 (Copyright Joseph Trotter, EUA). Os gráficos de barra (figura 1), de dispersão (figuras de 3 a 6) e a regressão linear feita para obtenção do valor de “B”, usado na equação Abs.m/B (onde Abs.m = Absorbância média e “B” = coeficiente linear obtido da regressão linear da curva padrão), para análise dos valores de IFN $\gamma$  nos SNs das culturas e elaboração de gráficos, foi utilizado o programa MicroCal Origin 3.01 (MicroCal Software Inc., EUA).



**Esquema 1. Fluxograma resumindo os métodos experimentais usados neste estudo.**

## ***RESULTADOS***

---

## Dados clínicos e resposta in vivo dos pacientes com AR ao teste tuberculínico

<b>Id</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Tratamento</b>	<b>PPD Cutâneo</b>
<b>P1</b>	F	46	Metotrexato e Prednisona	<b>R (10 mm)</b>
<b>P2</b>	F	40	Metotrexato e DFZ	<b>R (5 mm)</b>
<b>P3</b>	F	49	Metotrexato, Ácido Fólico, Paracetamol e Prednisona	<b>NR</b>
<b>P4</b>	F	44	Prednisona, Metotrexato, Cloroquina e Sulfasalazina	<b>NR</b>
<b>P5</b>	F	53	Metotrexato, Prednisona, Ácido Fólico e Diclofenaco Potássio	<b>NR</b>
<b>P6</b>	M	52	Prednisona, Metotrexato Ácido Fólico, Atenolol, Sinvastatina e Rivotril	<b>NR</b>
<b>P7</b>	M	43	Metotrexato, Ácido Fólico e Diclofenaco Potássio	<b>NR</b>
<b>P8</b>	F	33	Metotrexato e Ácido Fólico	<b>NR</b>

**Tabela1 . Dados dos pacientes participantes deste estudo.** Dados relevantes de cada indivíduo associados a seu código de identificação.  
Questionário com o histórico de Tb dos pacientes do estudo em ANEXO, página 90;  
Detalhamento dos dados clínicos dos pacientes do estudo em ANEXO, página 91;  
Tempo/AR – Tempo de AR em anos;  
PPD cutâneo: NR – Não reator, R - Reator.

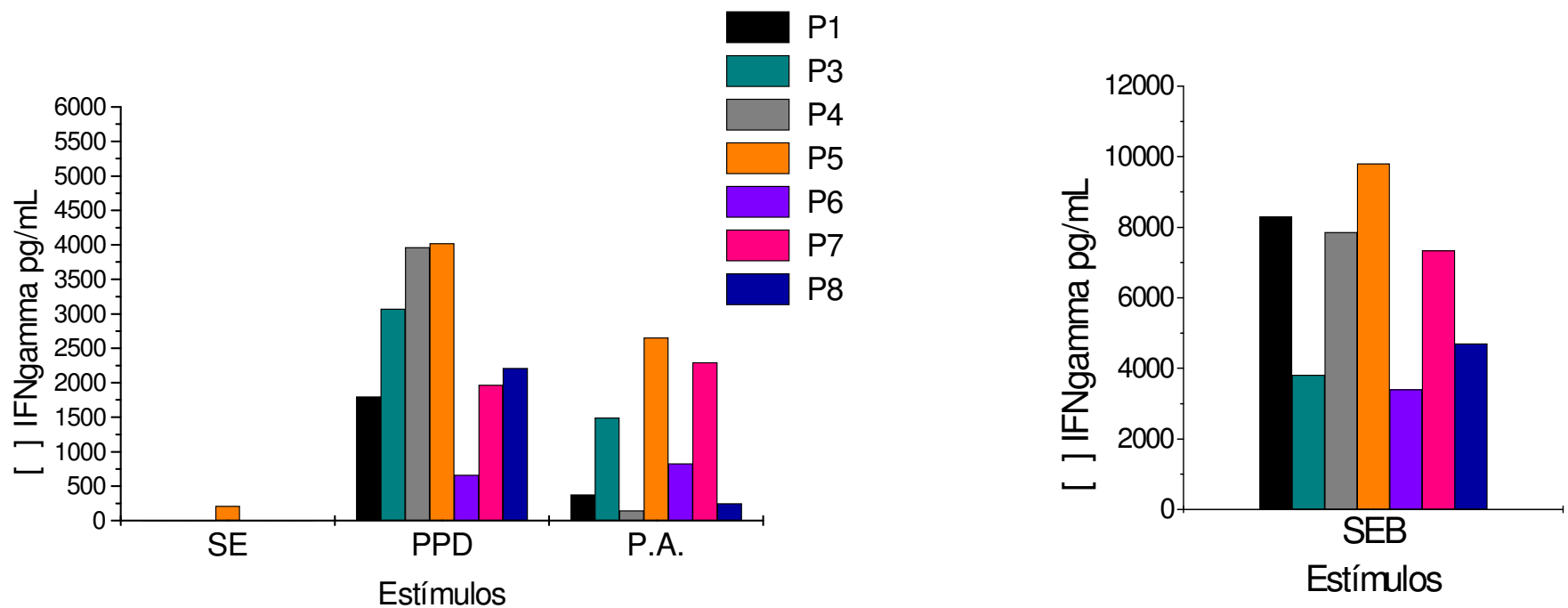
### Níveis de IFN $\gamma$ em sobrenadantes de culturas estimuladas com SEB, PPD e PA

Dois dos oito pacientes são reatores ao teste do PPD (Tabela I). Para esclarecer a natureza da não-resposta ao PPD no teste cutâneo, CMS destes pacientes foram estimuladas *in vitro* com antígenos micobacterianos e SEB, e os níveis de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de CMS foram avaliados por ELISA. O uso de SEB como controle positivo mostra que as células de todos os pacientes deste estudo apresentavam capacidade de produção de IFN $\gamma$  preservada, apesar da terapêutica para AR. Da mesma forma, a produção de IFN $\gamma$  *in vitro*, em resposta ao PPD, ocorre em todos os 8 pacientes avaliados e,

com exceção de um único indivíduo (P6), os demais respondiam *in vitro* ao PPD com níveis iguais ou superiores aos observados em um dos indivíduos reatores (P1; Figura 1).

A resposta aos peptídeos correspondentes a proteína ESAT-6 (PA), uma proteína específica de *M. tuberculosis*, mostra que, em comparação com os pacientes que apresentam o teste tuberculínico negativo (P3, P5, P7), ocorre baixos níveis de produção de IFN $\gamma$  no único paciente com teste cutâneo positivo para PPD (P1). Um outro aspecto digno de nota é que, em 4 pacientes (P1, P3, P4 e P8), níveis elevados de resposta *in vitro* ao PPD não são acompanhados de respostas semelhantes a PA (Fig. 1).

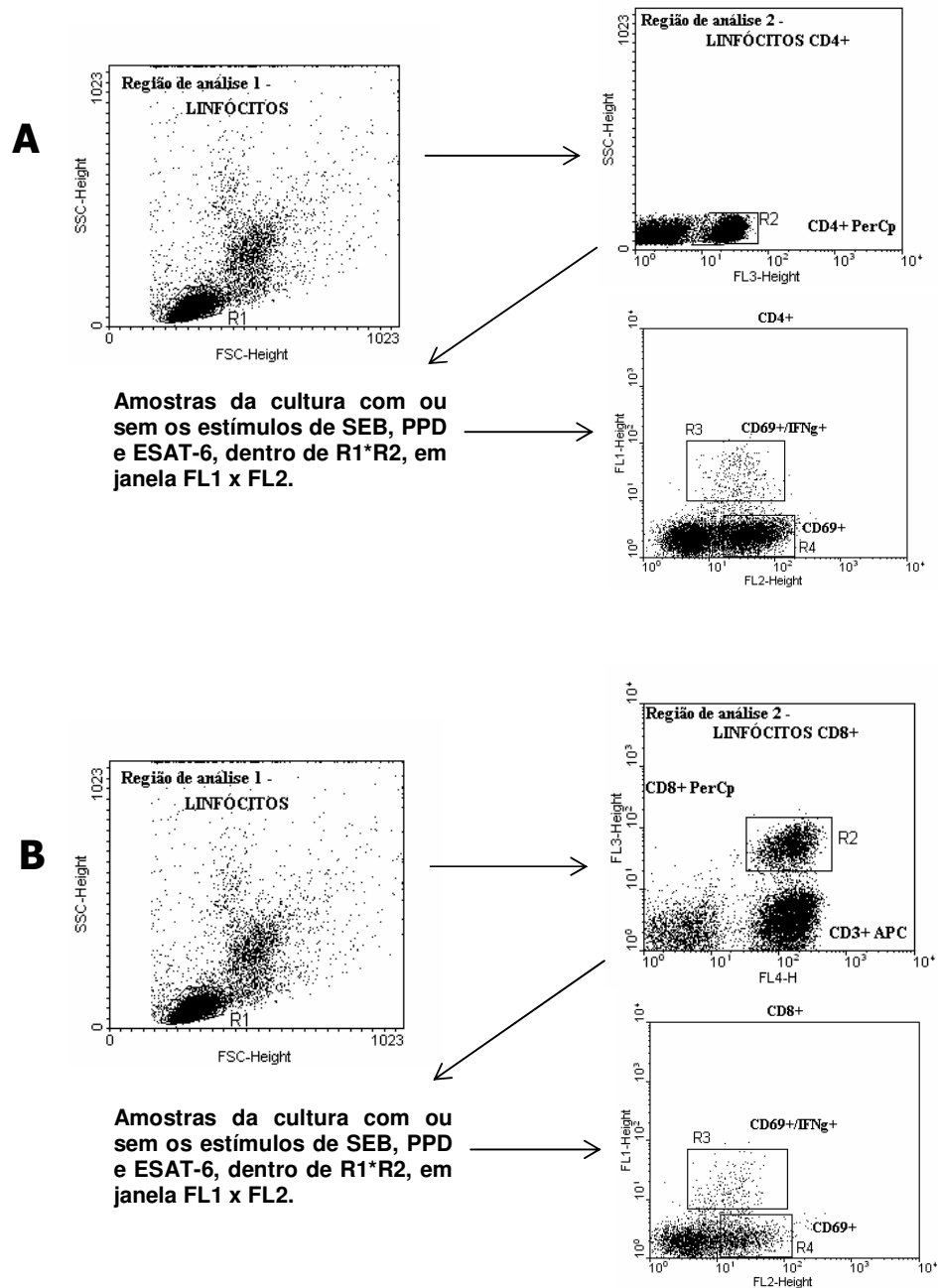
Desta forma, a negatividade ao teste tuberculínico não corresponde a ausência de células específicas para PPD ou *M. tuberculosis* nos pacientes com AR. Além disto, as discrepâncias observadas quando a resposta ao PPD *in vivo* e *in vitro* são comparadas com a resposta a PA, sugerem que o PPD não está identificando apenas a resposta específica para o *M. tuberculosis*. Tomadas em conjunto com o trabalho de Ponce de Leon e Cols. (2005), estas observações podem ser evidências para a inabilidade do teste tuberculínico em detectar a exposição ao *M. tuberculosis* na maioria dos indivíduos com AR, previamente infectados por esta bactéria.



**Figura 1. Avaliação dos níveis de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de CMS de pacientes com AR por ELISA.** As CMS foram incubadas na presença de SEB (controle positivo), PPD e PA. As concentrações de IFN $\gamma$  foram determinadas pela equação: Abs. Média/B, em pg/mL, considerando os fatores de diluição usados. *Cut-off* de positividade: 125 pg/mL (Vide valores em ANEXOS – página 88). Os SNs do paciente 2 não foram dosados.



Análise de subpopulações de linfócitos T ativadas por SEB, PPD e peptídeos de ESAT-6 em CMS de pacientes com AR



**Figura 2. Identificação de linfócitos T antígeno-específicos.** O protocolo experimental usado para avaliação do comportamento e participação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ em resposta a antígenos do *M. tuberculosis* exigiu a padronização da aquisição e análise das amostras. (A) Definição de região de linfócitos (R1); Definição de região de linfócitos T CD4+ (PerCP) (R2); (B) Definição de região de linfócitos (R1); Definição de região de linfócitos T CD8+ (PerCP) e CD3+ (APC) (R2); (A e B) R3 e R4 identificam linfócitos T CD69+/IFN $\gamma$ + e CD69+, respectivamente.

Na figura 2 observamos como foram feitas as análises das subpopulações de CMS estimuladas *in vitro*: (A) Considerando o tamanho e a granulosidade das células da amostra delimitou-se uma região com linfócitos (R1) no “dot-plot” mostrando níveis de espalhamento luminoso em linha reta (FSC) e em ângulo reto (SSC) em amostra de CMS; A partir desta região cria-se uma região R2, constituída apenas de células CD4<sup>+</sup> (FL3); Todas as amostras da cultura foram analisadas dentro de uma região lógica R1\*R2 (linfócitos T CD4<sup>+</sup>) para expressão de CD69 (PE-FL2) e IFN $\gamma$  (FITC-FL1). (B) Cria-se uma mesma região R1 (linfócitos) e desta gera-se a região R2 avaliando as células CD3<sup>+</sup> (FL3) e CD8<sup>+</sup> (FL4). As amostras da cultura foram analisadas dentro da região lógica R1\*R2 para expressão de CD69 (PE-FL2) e IFN $\gamma$  (FITC-FL1).

Observamos que o protocolo experimental padronizado permite a detecção de linfócitos T, CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, antígeno-específicos. A ativação e a produção intracelular de citocina em resposta aos antígenos do *M. tuberculosis* foi verificada através da dupla-positividade (FL1+/FL2+) das células na região 3 (R3). O percentual de células em R3 nos deu a positividade ou negatividade da resposta ao antígeno.

Pacientes positivos e negativos para o teste tuberculínico podem ter freqüências semelhantes de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, não-produtores de IFN $\gamma$ , ativados por antígenos de *M. tuberculosis*

CD69 é uma glicoproteína de membrana expressa em todas as linhagens celulares derivadas da medula, exceto hemácias, tendo caráter indutível em linfócitos T. É conhecida como a molécula de expressão mais precoce na membrana dos linfócitos T ativados podendo ser atuante como co-estímulo no

processo de ativação e diferenciação celular (Abbas & Lichtman, 2003; Sancho *et al.*, 2004). Em nossos experimentos, CD69 permitiu a identificação de linfócitos T recentemente ativados *in vitro*, por um determinado estímulo capaz de induzir transdução de sinal no receptor antigênico destas células.

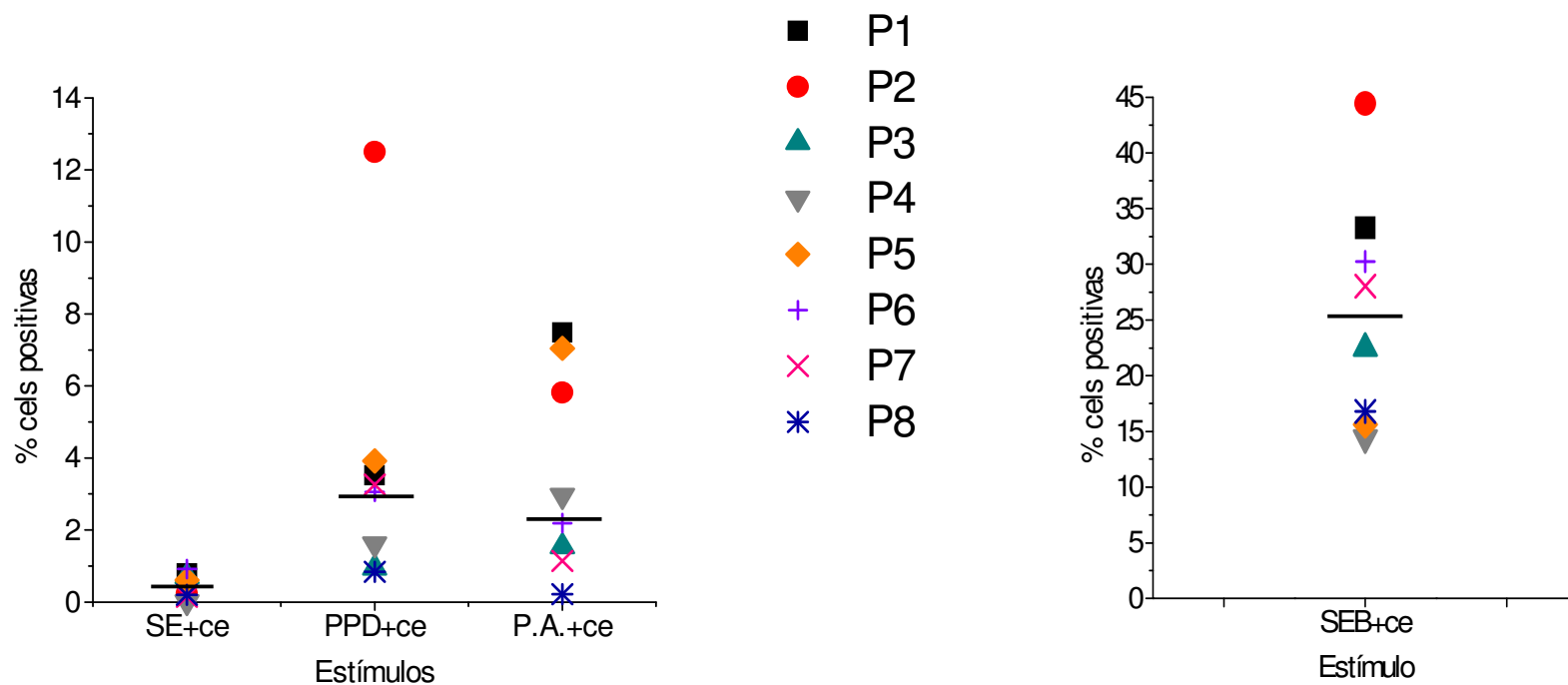
As freqüências de linfócitos T CD4+ e CD8+ que respondem a SEB, um superantígeno, na população investigada, mostram que a capacidade de ativação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ não-produtores de IFN $\gamma$  nos pacientes com AR está preservada (Fig. 3 e Fig. 4). Quando CMS dos dois pacientes com teste cutâneo positivo (P1, P2) foram avaliadas por citometria de fluxo, as mais altas freqüências de linfócitos T CD4+ não-produtores de IFN $\gamma$ , respondedores a PPD de todo o grupo foram observadas (Fig. 3). Porém, freqüências semelhantes à de P1 para esta subpopulação CD4+, PPD-específica, foram observadas em P5, P6 e P7, que tiveram testes cutâneos negativos.

Linfócitos T CD8+ negativos para IFN $\gamma$ , respondedores a PPD, também foram observados nos pacientes com testes tuberculínicos positivos e negativos (Fig. 4). Estas observações são consistentes com a hipótese de que o teste cutâneo utilizando PPD não detecta a maioria dos pacientes com AR previamente expostos ao *M. tuberculosis*.

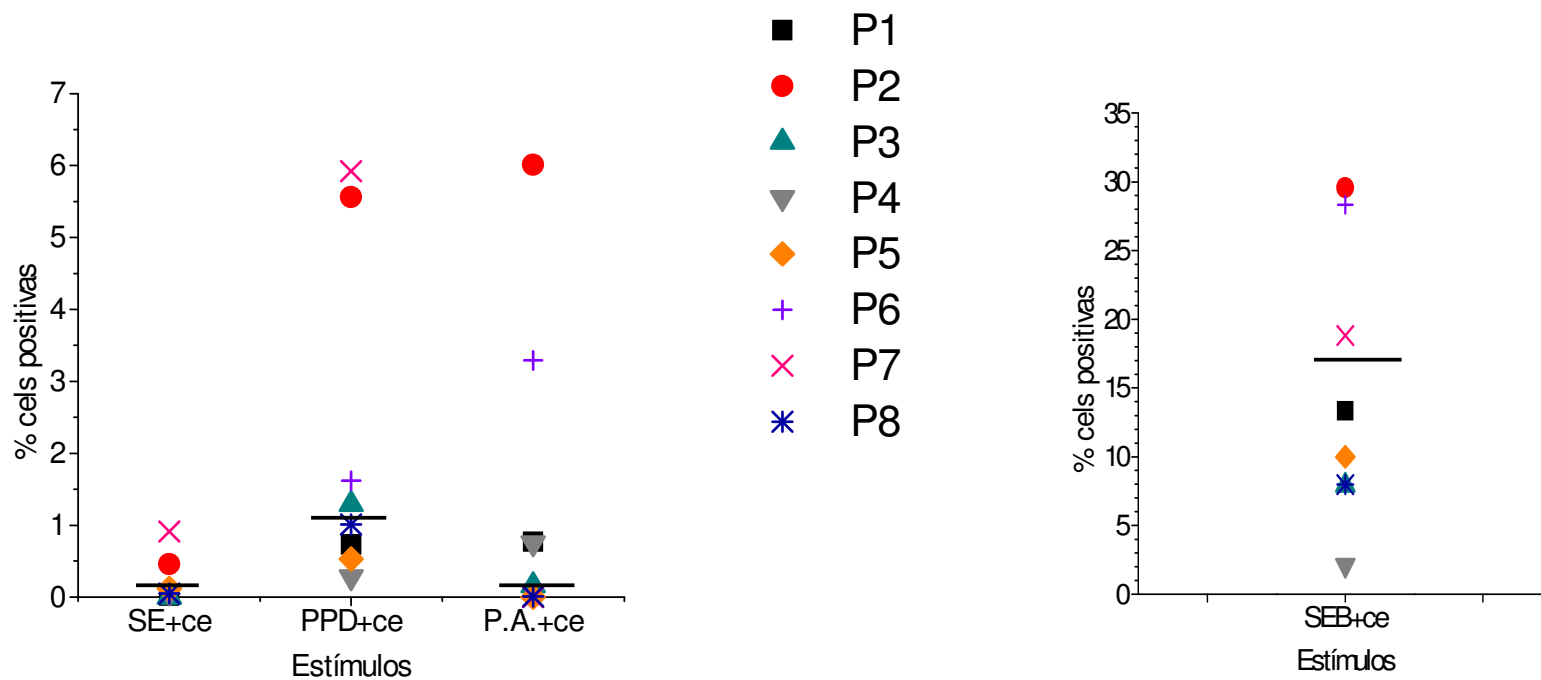
Freqüências elevadas de linfócitos T específicos para *M. tuberculosis* (PA) foram observadas nos dois pacientes positivos para o teste tuberculínico, porém freqüências também elevadas em linfócitos T CD4+, IFN $\gamma$ -negativos específicos para PA também foram detectadas em um paciente (P5), PPD-negativo. Linfócitos T CD8+ não-produtores de IFN $\gamma$  tiveram a freqüência mais alta em um dos pacientes com teste cutâneo positivo (P2), porém, um outro paciente PPD-positivo

(P1) apresentava freqüência desta subpopulação menor do que a maioria dos pacientes PPD-negativos.

Estas células, específicas para antígenos micobacterianos, podem incluir tanto linfócitos T em diferenciação, que passarão a produzir IFN $\gamma$  em uma etapa posterior de maturação, quanto células de outras linhagens, como por exemplo os linfócitos Th<sub>L17</sub> associadas ao desenvolvimento de lesões inflamatórias crônicas (Lubberts *et al.*, 2005).



**Figura 3. Frequências de linfócitos T CD4+ não-produtores de IFN $\gamma$  ativados (CD69+/IFN $\gamma$ ) por SEB (controle positivo), PPD ou PA (ESAT-6) em pacientes com AR** (Vide valores em ANEXOS – página 83). CMS dos pacientes com AR (P1 a P8) foram mantidas em cultura por 6 horas com os estímulos especificados, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD28 e anti-CD49d como co-estímulo (ce), com brefeldina A adicionada 1 hora após início da cultura, e posteriormente marcadas com os anticorpos monoclonais de especificidades desejadas para moléculas de superfície (CD69, CD4) e intracelular (IFN $\gamma$ ), após tratamento com solução de permeabilização. A Fig. 3 mostra as frequências de linfócitos T CD4+ ativados, não-produtores de IFN $\gamma$ , em resposta aos estímulos específicos, determinadas por citometria de fluxo. As barras indicam as medianas de cada grupo (vide valores em ANEXOS – página 85).



**Figura 4. Frequências de linfócitos T CD8+ não-produtores de IFN $\gamma$  ativados (CD69+/IFN $\gamma$ -) por SEB (controle positivo), PPD ou PA (ESAT-6) em pacientes com AR** (Vide valores em ANEXOS – página 83). CMS dos pacientes com AR (P1 a P8) foram mantidas em cultura por 6 horas com os estímulos especificados, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD28 e anti-CD49d como co-estímulo (ce), com brefeldina A adicionada 1 hora após início da cultura, e posteriormente marcadas com os anticorpos monoclonais de especificidades desejadas para moléculas de superfície (CD69, CD3 e CD8) e intracelular (IFN $\gamma$ ), após tratamento com solução de permeabilização. A Fig. 4 mostra as frequências de linfócitos T CD8+ ativados, não-produtores de IFN $\gamma$ , em resposta aos estímulos específicos, determinadas por citometria de fluxo. As barras indicam as medianas de cada grupo (vide valores em ANEXOS – página 85).

Linfócitos T produtores de IFN $\gamma$ , específicos para PPD e antígenos de *M. tuberculosis* estão presentes no sangue de pacientes com AR mesmo com teste cutâneo negativo para PPD

O IFN $\gamma$ , também chamado de Interferon tipo II, é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 e CD8<sup>+</sup>, é de suma importância na resposta a patógenos, especialmente os intracelulares. Como indutor de função inflamatória de macrófago, o IFN $\gamma$  estimula a síntese de óxido nítrico para a destruição do patógeno fagocitado (Rook *et al.*, 2005). Sua ação em macrófagos também induz a produção de TNF $\alpha$  por estas células, promovendo a atividade inflamatória (Abbas & Lichtman, 2003).

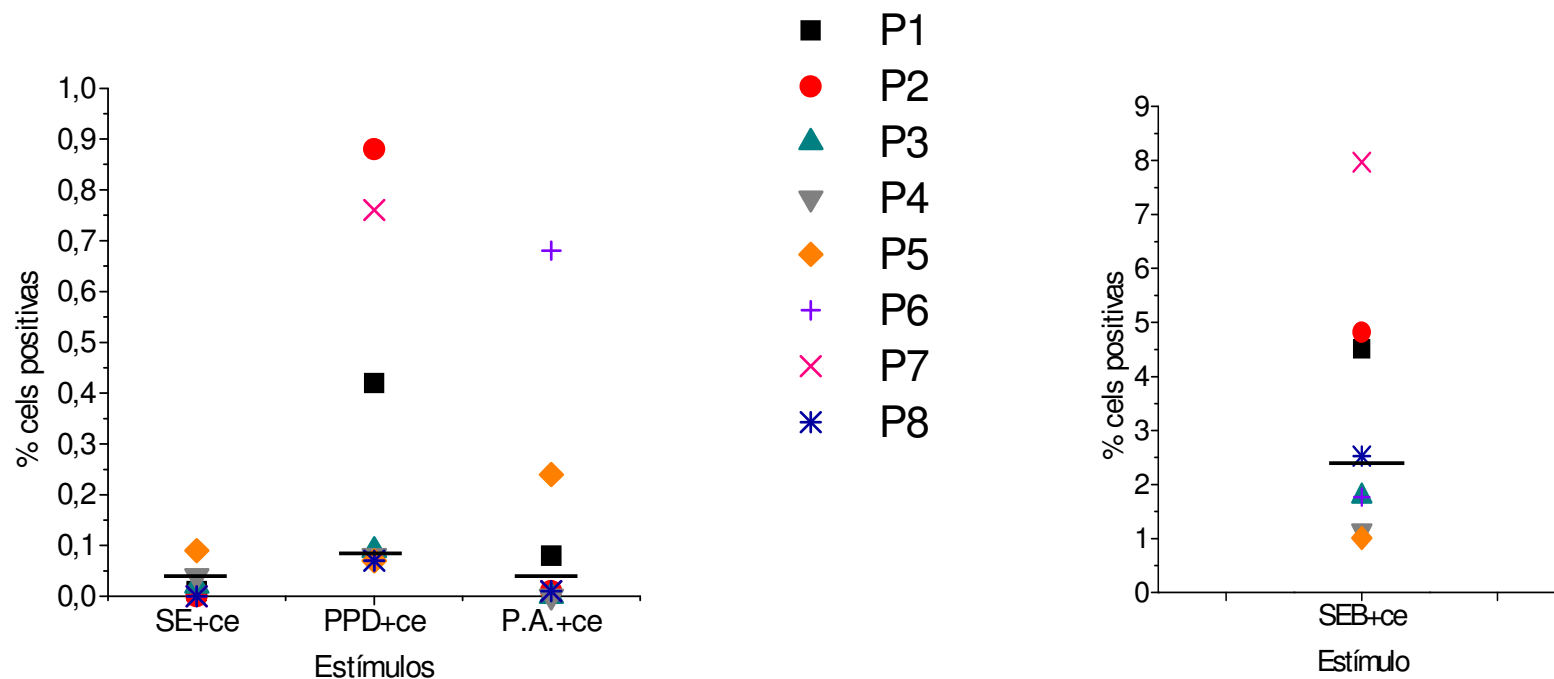
Analisando a figura 5 observamos que os indivíduos P1, P2 e P7 apresentaram as freqüências mais altas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados e produtores de IFN $\gamma$ , em resposta a PPD. P1 e P2 já haviam sido identificados pelo teste cutâneo como reatores, porém P7 apresentou PPD cutâneo negativo.

Em relação à resposta ao PA observamos que dois outros indivíduos, os quais apresentaram teste cutâneo não-reator, P5 e P6, tinham as maiores freqüências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> respondedores, enquanto que P1, P2 (teste cutâneo reator) e P7 (teste cutâneo não-reator) apresentavam freqüências baixas de resposta a este estímulo.

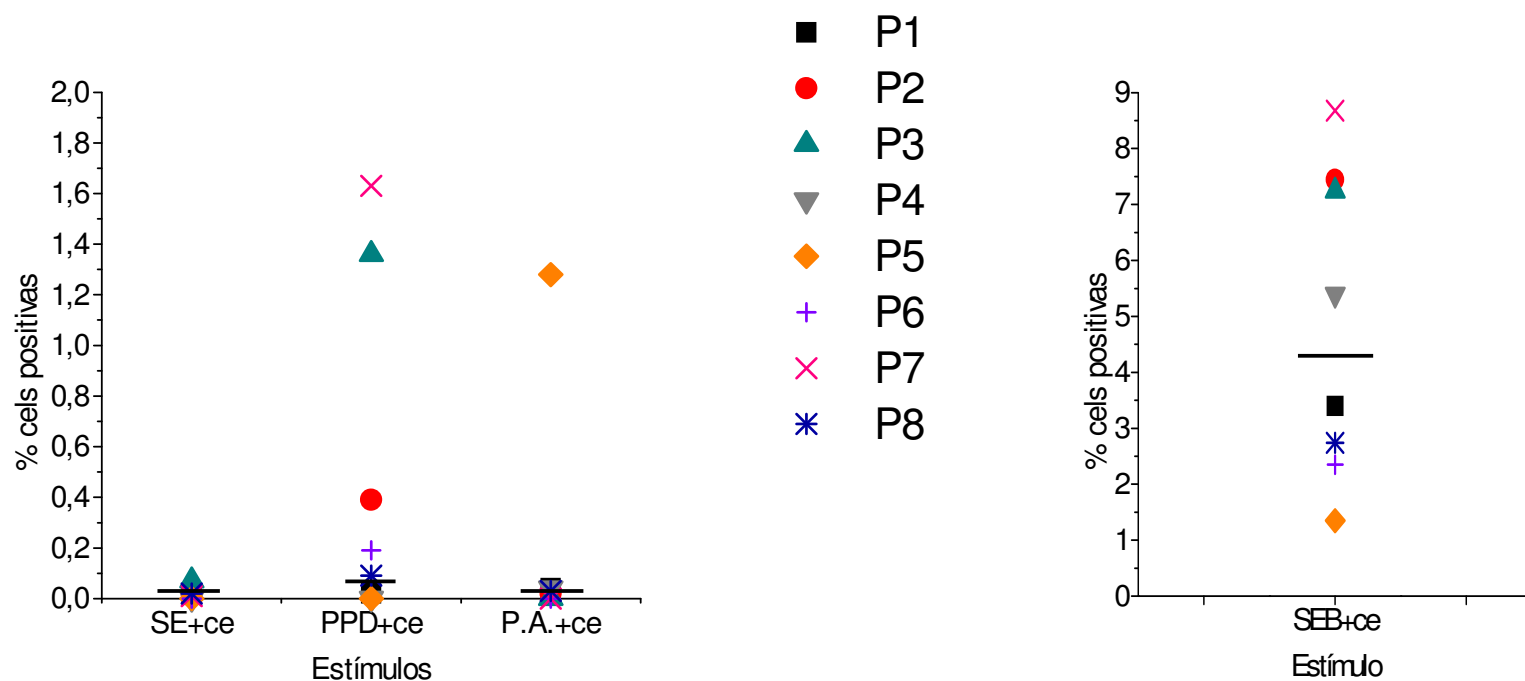
Desta forma, foram observados indivíduos com resposta específica para antígenos de *M. tuberculosis* (PA) e com teste cutâneo negativo para PPD entre os pacientes com AR deste estudo. Os três pacientes com freqüências maiores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN $\gamma$  em resposta ao PPD (P1, P2 e P7) não mostraram freqüências comparáveis de linfócitos T com este perfil de resposta ao PA.







**Figura 5. Frequência de linfócitos T CD4+ ativados e produtores de IFN $\gamma$  (CD69+/IFN $\gamma$ +) de pacientes com AR em resposta a SEB (controle positivo), PPD e PA** (Vide valores em ANEXOS – página 83). CMS dos pacientes com AR (P1 a P8) foram mantidas em cultura por 6 horas com os estímulos especificados, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD28 e anti-CD49d como co-estímulo (ce), com brefeldina A adicionada 1 hora após início da cultura, e posteriormente marcadas com os anticorpos monoclonais de especificidades desejadas para moléculas de superfície (CD69, CD4) e intracelular (IFN $\gamma$ ) após tratamento com solução de permeabilização. A Fig. 5 mostra as frequências de linfócitos T CD4+ ativados, produtores de IFN $\gamma$ , em resposta aos estímulos específicos, determinadas por citometria de fluxo. As barras indicam as medianas de cada grupo (vide valores em ANEXOS – página 85).



**Figura 6. Frequência de linfócitos T CD8+ ativados e produtores de IFN $\gamma$  (CD69+/IFN $\gamma$ +) de pacientes com AR em resposta a SEB (controle positivo), PPD e PA** (Vide valores em ANEXOS – página 83). CMS dos pacientes com AR (P1 a P8) foram mantidas em cultura por 6 horas com os estímulos especificados, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD28 e anti-CD49d como co-estímulo (ce), com brefeldina A adicionada 1 hora após início da cultura, e posteriormente marcadas com os anticorpos monoclonais de especificidades desejadas para moléculas de superfície (CD69, CD3 e CD8) e intracelular (IFN $\gamma$ ) após tratamento com solução de permeabilização. A Fig. 6 mostra as frequências de linfócitos T CD8+ ativados, produtores de IFN $\gamma$ , em resposta aos estímulos específicos, determinadas por citometria de fluxo. As barras indicam as medianas de cada grupo (vide valores em ANEXOS – página 85).

Por outro lado, os dois indivíduos com as maiores freqüências de linfócitos T CD4+ produtores de IFN $\gamma$  em resposta ao PA eram PPD negativos no teste cutâneo e *in vitro*, levantando dúvidas quanto à relevância do PPD para diagnóstico de Tb latente em pacientes com AR.

Avaliando os linfócitos T CD8+ ativados (Fig. 6), também são detectadas populações produtoras de IFN $\gamma$  específicas para PPD (P3 e P7) e peptídeos sintéticos de ESAT-6 (P5). A presença de linfócitos T CD8+ específicos para PPD se superpõe apenas parcialmente à da subpopulação CD4+. Existem evidências de que estas células têm papel relevante na proteção contra a Tb (Antas *et al.*, 2005; Rivas-Santiago *et al.*, 2005; Stegelman *et al.*, 2005), entretanto não está clara a relevância destas células para o diagnóstico de Tb latente ou ativa (Kaufmann, 2001).

## ***DISCUSSÃO***

---

Neste trabalho avaliamos a dimensão das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para antígenos micobacterianos derivados de *M. tuberculosis*, (PPD e PA), em amostras de sangue venoso de um grupo de pacientes com AR. Os pacientes participantes deste estudo são candidatos ao uso do esquema terapêutico biológico anti-TNF $\alpha$ , tratamento que pode induzir a evolução de Tb latente para doença sintomática em indivíduos com AR (Gómez-Reino *et al.*, 2003, Hochberg *et al.*, 2005). Por isso torna-se relevante saber se estes pacientes já estiveram em contato com o *M. tuberculosis* anteriormente.

A resposta ao teste cutâneo com PPD ainda é a forma padrão para identificar exposição/infecção latente pelo *M. tuberculosis*. Porém, o PPD pode se positivar em indivíduos vacinados com BCG, ou expostos a outras micobactérias que não o *M. tuberculosis* (Hughes *et al.*, 2005; Pai, 2005), gerando grande inespecificidade. Estes fatos são especialmente importantes no Brasil, país endêmico para Tb, e no qual a vacinação por BCG atinge uma parcela significativa da população. Além disto, não se sabe ao certo o quanto a AR pode afetar a resposta destes pacientes ao teste cutâneo e o quanto a terapêutica anti-inflamatória em uso nestes pacientes poderia afetar a resposta imune antígeno-específica e a positividade ao teste cutâneo (Sester *et al.*, 2004).

Assim, um teste *in vitro* com peptídeos sintéticos derivados de uma proteína específica do *M. tuberculosis*, como por exemplo o ESAT-6, ajudaria a aprofundar o entendimento da resposta dos pacientes com AR brasileiros ao *M.tuberculosis*, além de ter potencial para uma possível utilização futura em testes diagnósticos para detecção de infecção latente por *M. tuberculosis* nestes indivíduos. O uso de peptídeos sintéticos da proteína ESAT-6 (vide ANEXOS – página 89) já foi descrito em diversos trabalhos, inclusive para fins de diagnóstico

da Tb (Arend *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2003; Scarpellini *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005).

Fatores associados à negatividade da resposta *in vivo* ao PPD em pacientes com AR previamente expostos ao *M. tuberculosis*

Os dados observados mostraram a presença de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para PPD e para *M. tuberculosis* tanto em pacientes que apresentaram teste cutâneo positivo (n=2) quanto na maioria dos testados em nosso grupo (n=6), PPD-negativos.

Os pacientes com AR mostram alterações na sua diferenciação tímica, que está associada à redução da diversidade do repertório imunológico com senescência precoce do sistema imune. Na AR, no diabetes mellitus e progressivamente durante o envelhecimento são observadas freqüências elevadas de linfócitos T CD4+ CD28-, que apresentam algumas características fenotípicas de células *natural killer* (NK) e são potentes células efectoras e produtoras de citocinas. Estas células são encontradas nas lesões observadas nestas patologias e podem ser participantes fundamentais na patogênese das mesmas. A expansão clonal de subpopulações com este perfil pode ser uma conseqüência da involução tímica associada ao envelhecimento (Schirmer *et al.*, 1998).

Nestas condições, o compartimento de linfócitos T virgens não pode ter sua reposição homeostática de células a partir do timo. Assim, a expansão periférica de células virgens ocorre, em condições seletivas mais favoráveis para clones auto-reativos, e com redução progressiva da diversidade do repertório imunológico (Bryl *et al.*, 2001). Existem evidências de que este processo,

observado no envelhecimento normal, é bastante acelerado em indivíduos com AR (Goronzy & Weynand, 2003). Sem dúvida, a redução na diversidade do repertório imunológico, e na frequência de células virgens com capacidade de diferenciação normal para células de memória/efetoras, com capacidade adequada de migração para áreas como a pele, pode afetar a resposta imune antígeno-específica *in vivo*, inclusive em testes cutâneos.

Uma segunda possibilidade seria a ação da medicação utilizada pelos pacientes sobre a resposta inflamatória em reação de hipersensibilidade tardia, como é o caso do teste tuberculínico. Como os pacientes testados estavam em uso de terapêutica anti-inflamatória para AR, não fica excluída a modulação da resposta *in vivo* dos pacientes pelos medicamentos utilizados. A importância da IL-8 na indução da reação inflamatória associada ao teste tuberculínico positivo já foi evidenciada (Larsen *et al.*, 1995).

Trabalhos recentes mostram que o metotrexato, uma das drogas utilizadas pelos pacientes com AR, inclusive os incluídos neste trabalho, inibe receptores envolvidos em adesão leucocitária. Estes receptores são críticos para ativação de resposta imune e inflamatória, em aspectos tais como produção de IL-15 por células do conjuntivo inflamado, e em consequência disto a produção de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-17 por linfócitos T é modulada negativamente (Miranda-Carús *et al.*, 2004). Tais observações são confirmadas e complementadas por outras que demonstram o papel do metotrexato, nas doses utilizadas com finalidade terapêutica em AR, inibindo a expressão do antígeno cutâneo linfocitário (CLA), uma molécula de endereçamento (homing), importante para migração de linfócitos T de memória/efetores para a pele (Johnston *et al.*, 2005).

Um outro aspecto seria a existência de uma “milieu” que aumenta a possibilidade de diferenciação de linfócitos T antígeno-específicos com perfil Th<sub>IL17</sub>, em detrimento do perfil Th1 (Khader *et al.*, 2005; Pollard & Choy, 2005). Esta possibilidade será explorada em mais detalhes adiante, pois pode afetar tanto a resposta cutânea a antígenos micobacterianos, quanto à evolução da Tb latente para doença pulmonar ativa.

#### Linfócitos T produtores de IFN $\gamma$ em resposta a PPD e PA foram identificados em pacientes com testes cutâneos positivos e negativos

Neste estudo observamos a produção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos T ativados (CD69+), tanto nas subpopulações CD4+ quanto nas CD8+ em resposta a PPD e ao PA. Observamos também produção de IFN $\gamma$  nos pontos estimulados com SEB, usado como controle positivo, mesmo em indivíduos que não responderam aos estímulos antigênicos, mostrando que estas células não tinham sua capacidade de resposta imune bloqueada pela terapêutica anti-inflamatória.

Kawashiwa e Miossec (2005) observaram que os pacientes com AR no tempo 0 (zero) de seu tratamento com anti-TNF $\alpha$ , já apresentavam níveis consideravelmente mais baixos de IFN $\gamma$  do que os controles (sem AR). Não está excluída a possibilidade de uma frequência reduzida de linfócitos T produtores de IFN $\gamma$  em pacientes com AR, uma vez que a presença de uma doença inflamatória crônica pode estar associada a um microambiente mais favorável à diferenciação de linfócitos T para o perfil Th<sub>IL17</sub> (Kawashiwa & Miossec, 2005).

#### PPD cutâneo x análise antígeno-específica *in vitro*



Na análise individual dos dados dos pacientes, observamos que os pacientes P1 e P2 que apresentaram PPD cutâneo reator (vide tabela 1) apresentavam percentagens altas de linfócitos T, tanto CD4+ quanto CD8+, respondedores (produtores de IFN $\gamma$ ) para o PPD. Este fato mostra que podemos observar correlação entre os dados obtidos pelos dois tipos de exames em alguns indivíduos. Porém, P7 foi não-reator no teste tuberculínico e foi respondedor no teste *in vitro*, sugerindo que a análise *in vitro*, por citometria de fluxo, é capaz de identificar indivíduos falso-negativos no teste cutâneo.

Ponce de Leon e colaboradores (2005) observaram que uma grande porcentagem de pacientes com AR, independente do estágio da doença, apresentavam PPD cutâneo negativo em local com alta incidência de Tb. Esses dados sugerem uma baixa capacidade de resposta dos pacientes com AR ao PPD no teste cutâneo.

Apesar do PPD, usado no teste cutâneo, ser uma mistura de proteínas purificadas do *M. tuberculosis* sabe-se que esta não corresponde apenas antígenos exclusivos do *M. tuberculosis*, mas também compartilhados com outras micobactérias, como *M. bovis* e *M. leprae*, tornando a especificidade deste teste para detecção de Tb baixa (Lee & Holzman, 2002; Sester *et al.*, 2004). Tais observações foram consistentes com nossos resultados, pois quando estimulamos os linfócitos T dos pacientes com PA (*pool* de peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos antigênicos de ESAT-6, exclusivos do *M. tuberculosis*), observamos que os indivíduos PPD-negativos P5 (CD4+ e CD8+) e P6 (CD4+) passam a ser os respondedores mais fortes, quando PA foi utilizada como estímulo.

Esses dados nos levam a concluir que parece existir correlação direta entre os resultados dos testes *in vitro* e cutâneos para PPD. Porém, a positividade nestes nos mostra apenas que o paciente entrou em contato com alguma espécie de micobactéria, não especificamente com *M. tuberculosis*, enquanto que a avaliação de PA nos mostra aquele indivíduo que apresenta linfócitos T ativado *in vitro* (CD69+) ou ativado/produtores de IFN $\gamma$  (CD69+/IFN $\gamma$ +) *M. tuberculosis* – específicos.

## ***CONCLUSÕES***

---

1) Os pacientes com AR investigados neste trabalho, negativos para o teste tuberculínico, são em sua maioria respondedores ao PPD *in vitro*, inclusive com produção de IFN $\gamma$ , em níveis equivalentes aos de pacientes reatores ao PPD no teste cutâneo;

2) Não há equivalência da resposta *in vitro* a peptídeos sintéticos correspondentes à proteína ESAT-6 (PA), específica de *M. tuberculosis*, com a resposta *in vivo* ou *in vitro* ao PPD, sugerindo que exposição a outras micobactérias que não o *M. tuberculosis* pode estar relacionada com PPD cutâneo positivo nos pacientes com AR estudados;

3) As freqüências de linfócitos T específicos para PA e PPD, não-produtores e produtores de IFN $\gamma$ , demonstram que as populações de linfócitos T de memória específicos para antígenos micobacterianos podem ter dimensões equivalentes em pacientes com AR reatores e não-reatores no teste tuberculínico. Assim, a negatividade ao teste está provavelmente associada à redução na capacidade destas células de migrar para a pele e/ou de induzir resposta inflamatória cutânea em resposta ao PPD;

4) Os antígenos micobacterianos usados neste trabalho promovem a ativação de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que não produzem IFN $\gamma$ . Entretanto, a função destas células nos pacientes com AR ainda exige esclarecimentos;

Tomadas em conjunto estas observações colocam em questão a relevância do teste tuberculínico para identificar Tb latente em pacientes com AR em área endêmica, levando a necessidade de uma investigação prospectiva em pacientes com AR, positivos *in vitro* para PPD e/ou antígenos *M.tuberculosis*-específicos, avaliando níveis de produção de citocinas tais como IFN $\gamma$  e IL-17, e subpopulações de linfócitos T específicas para *M. tuberculosis*, em correlação com prognóstico de evolução para Tb ativa.

***PERSPECTIVAS***

---

Os resultados obtidos neste estudo são interessantes e ajudam numa melhor compreensão da participação do sistema imune dos pacientes com AR no controle de uma possível Tb latente, bem como indica uma limitação do uso do teste tuberculínico nestes pacientes, para diagnóstico de Tb. Porém, alguns pontos poderiam ser melhor esclarecidos para o aprimoramento deste trabalho.

Inicialmente, a conduta mais esperada seria de acompanhar os pacientes presentes neste estudo, fazendo uma investigação prospectiva nos indivíduos que foram positivos *in vitro* para PPD e/ou antígenos específicos de *M. tuberculosis*.

Em seguida, aumentar o número de pacientes da pesquisa seria de grande relevância para uma melhor comparação do comportamento dos linfócitos T dos indivíduos avaliados e garantir uma maior confiabilidade no tratamento estatístico utilizado. Outro passo seria o de comparar os resultados obtidos nos pacientes com AR com indivíduos controles para aprofundar os conhecimentos adquiridos no trabalho. Alguns grupos-controle poderiam ser estabelecidos, dentre eles: (1) Indivíduos saudáveis que, sabidamente, não apresentem infecção tuberculosa, porém apresentam o mesmo nível de exposição ao *M. tuberculosis* observado nos pacientes deste estudo, (2) Indivíduos sem AR ou Tb e ainda (3) Indivíduos com outras doenças auto-imunes que fazem uso de medicamentos imunossupressores semelhantes aos dos pacientes deste estudo.

Por fim, caracterizar melhor os linfócitos T CD4+ e CD8+ que foram ativados pelos antígenos usados na pesquisa (CD69+) porém não produziam IFN $\gamma$ , citocina ativa na resposta ao *M. tuberculosis*. Avaliar se estas células ainda não estavam na etapa de produção de IFN $\gamma$  ou se estariam produzindo algum outro tipo de citocina atuante na inflamação, como por exemplo IL-17.

## Proposta de via inflamatória alternativa

Como dito anteriormente, o IFN $\gamma$  é uma citocina comumente encontrada em processos inflamatórios. Apesar de outras células produzirem esta citocina, boa parte do IFN $\gamma$  disponível, vem dos linfócitos T CD4 $^{+}$ , diferenciados para o perfil Th1 por conta, principalmente, da ação de IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas (DCs) e fagócitos mononucleares.

Além dos linfócitos T CD4 $^{+}$  Th1, existe a subpopulação Th2, produtora de IL-4 (indutora de resposta humoral) que antagoniza a produção de IFN $\gamma$  pelas Th1 (Abbas & Lichtman, 2003). Ambas as subpopulações, Th1 e Th2, são resultado de ativação linfocitária em consequência de estimulação antigênica persistente, promovida pelo reconhecimento, via receptor de linfócito T (TCR), de peptídeos antigênicos, e da ação de moléculas co-estimuladoras, seguida da ação de citocinas indutoras no processo de polarização (Abbas & Lichtman, 2003). Porém, muitos trabalhos mostram que quando a DC reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em moléculas como lipopolissacarídeos (LPS) ou CpG, normalmente via *Toll-like* receptor 4 (TLR4), ela produz IL-12, que atuará sobre os linfócitos T ativados, polarizando-os para Th1. Quando a DC reconhece moléculas como peptidoglicanos, geralmente via TLR2, ocorre a produção de IL-23 (outra citocina pró-inflamatória e com similaridade estrutural com IL-12), que leva a diferenciação de outra sub-população linfocitária, as Th<sub>IL-17</sub>, produtoras de IL-17 (e também IL-6 e TNF $\alpha$ ) e não produtoras de IFN $\gamma$  (Aggarwal *et al.*, 2003; Kolls & Linden, 2004; Langrish *et al.*, 2004; Khader *et al.*, 2005; Langrish *et al.*, 2005).



Estudos recentes mostram o importante papel da IL-17 na progressão de doenças auto-imunes inflamatórias, como encefalite e artrite induzida por colágeno (modelo para estudos sobre AR), em modelos experimentais (Kolls & Linden, 2004; Khader *et al.*, 2005). Outros trabalhos mostram grande quantidade de IL-17 no líquido sinovial de pacientes com AR (Chabaud *et al.*, 1999; Pollard & Choy, 2005).

Na Tb, sabe-se que o papel de IL-12 é essencial para gerar células produtoras de IFN $\gamma$ , citocina que atua diretamente no controle desta doença e que IL-23 tem papel menos relevante neste processo (Khader *et al.*, 2005; Ottenhoff *et al.*, 2005).

Caso estudos mais aprofundados demonstrem que diferenciação de linfócitos T para o perfil Th<sub>IL-17</sub> tem papel realmente importante na progressão inflamatória da AR, poderíamos propor a hipótese de que este microambiente mais favorável à diferenciação para o perfil Th<sub>IL-17</sub> pode também favorecer o aumento da incidência de Tb nestes pacientes. Uma maior frequência de linfócitos Th<sub>IL-17</sub> específicos para o *M. tuberculosis*, com redução na frequência de células diferenciadas para o perfil Th1 (produtoras de IFN $\gamma$ ) de mesma especificidade, poderá ter como consequência a redução na produção de IFN $\gamma$  em resposta ao *M. tuberculosis*, tornando mais provável a transformação de uma infecção latente em doença ativa.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

1. AARON L, SAADOUN D, CALATRONI I, LAUNAY O, MÉMAIN N, VINCENT V, MARCHAL G, DUPONT B, BOUCHAUD O, VALIERE D & LORTHOLARY O. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. Clin Microbiol Infect. 2004; 10:388-398.
2. ABBAS AK & LICHTMAN AH. Cellular and molecular immunology. Saunders Company: 2003; Seção IV.
3. AGGARWAL S, GHILARDI N, XIE MH, DE SAUVAGE FJ & GURNEY AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem. 2003; 278:1910-1914.
4. ANTAS PRZ, CARDOSO FLL, PEREIRA KC, FRANKEN KLMC, CUNHA KS, KLATSER P, SARNO EN, OTTENHOFF THM & SAMPAIO EP. T cell immune responses to mycobacterial antigens in brazilian tuberculosis patients and controls. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005; 99:699-707.
5. AREND SM, GELUK A, VAN MEIJGAARDEN KE, VAN DISSEL JT, THEISEN M, ANDERSEN & OTTENHOFF THM. 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. Infection and Immunity 2000; 68:3314-3321.
6. ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA, McSHANE DJ, FRIES JF, COOPER NS, HEALEY LA, KAPLAN SR, LIANG MH, LUTHRA HS, MEDSGER TA, MITCHELL DM, NEUSTADT DH, PINALS RS, SCHALLER JG, SHARP JT, WILDER RL & HENDER GG. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthr Rheum. 1988; 31:315-324.
7. ARTHRITIS FOUNDATION. Rheumatoid Arthritis. Disponível na URL: <http://www.arthritis.org/conditions/diseasecenter/RA/default.asp>. 2005.

8. BALANDRAUD N, ROUDIER J & ROUDIER C. What are the links between Epstein-barr virus, lymphoma and tumor necrosis factor antagonism in rheumatoid arthritis? *Semin Arthritis Rheum.* 2005; 34 (Supl 1): 31-33.
9. BALTUSSEN R, FLOYD K & DYE C. Cost effectiveness analysis of strategies for tuberculosis control in developing countries. *BMJ* 2006; 331:1364-1368.
10. BASS JB, FARER LS, HOPEWELL PC, JACOBS RF & SNIDER DE. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis.* 1990; 142: 725-735.
11. BLUMBERG HM, LEONARD MK & JASMER RM. Update on the treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. *JAMA* 2005; 293:2776-2784.
12. BOTHA T & RYFFEL B. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. *J Immunol.* 2003; 171:3110-3118.
13. BRYL E, VALLEJO AN, WEYAND CM & GORONZY JJ. Down-Regulation of CD28 Expression by TNF-alpha. *J Immunol.* 2001; 167:3231-3238.
14. CARTY SM, SWONDEN N & SILMAN AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63 (Supl II): ii46-ii49.
15. CHABAUD M, DURAND JM, BUCHS N, FOSSIEZ F, PAGE G, FRAPPART L & MIOSSEC P. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:963-970.
16. COLIGAN JE. *Current protocols in immunology.* John Wiley & Sons, Inc., 1991 e atualizações, Cap. 5 e Cap. 6, Unid. 6.24.

17. COSTA YS. Microbiologia e parasitologia. Ed. Imprensa Livre, 1998; Cap. VIII, Seção 13.
18. DAVEY HM & KELL DB. Flow cytometry and cell sorting heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev.* 1996; 60: 641-696.
19. DOHERTY TM, DEMISSIE A, MENZIES D, ANDERSEN P, ROOK G, ZUMLA & VACSEL Study Group. Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Meth.* 2005; 298:129-141.
20. EHRENSTEIN MR, EVANS JG, SINGH A, MOORE S, WARNES G, ISENBERG DA & MAURI C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* 2004; 200:277-285.
21. FURST DE, CUSH J, KAUFMANN S, SIEGEL J & KURTH R. Preliminary guidelines for diagnosis and treating tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis in immunosuppressive trials or being treated with biological agents. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(Supl II):ii62-ii63.
22. GALLIN JI & SNYDERMAN R. Inflammation: basic principles and clinical correlates. Lippincott Williams & Wilkins: Filadélfia, 1999; Cap. 64.
23. GOLDBLATT F & ISENBERG DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005; 140:195-204.
24. GOLDEN MP & VIKRAM HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician.* 2005; 72: 1761-1768.

25. GOMEZ-REINO JJ, CARMONA L, VALVERDE VR, MOLA EM & MONTERO MD - BIOBADASER GROUP. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:2122-2127.
26. GORONZY JJ & WEYAND CM. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5:225-234.
27. GORONZY JJ & WEYAND CM. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2005; 201:55-73.
28. HATA H, SAKAGUCHI N, YOSHITOMI H, IWAKURA Y, SEKIKAWA K, AZUMA Y, KANAI C, MORIIZUMI E, NOMURA T, NAKAMURA T & SAKAGUCHI S. Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest.* 2004;114:582-588.
29. HERNANDEZ-CRUZ B, SIFUENTES-OSORNIO J, PONCE-DE-LEON ROSALES S, PONCE-DE-LEON GARDUNO A, DIAZ-JOUANEN E. *Mycobacterium tuberculosis* infection in patients with systemic rheumatic diseases. A case-series. *Clin Exp Rheumatol.* 1999;17:289-296.
30. HILL PC, JACKSON-SILLAH D, FOX A, FRANKEN KLMC, LUGOS MD, JEFFRIES DJ, DONKOR SA, HAMMOND AS, ADEGBOLA RA, OTTENHOFF THM, KLEIN MR & BROOKES RH. ESAT-6 CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by *ex vivo* enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. *J Clin Micro.* 2005; 43: 2070-2074.

31. HOCHBERG MC, LEBWOHL MG, PLEVY SE, HOBBS KF & YOCUM DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Semin Arthritis Rheum*. 2005; 34:819-836.
32. HUGHES AJ, HUTCHINSON P, GOODING T, FREEZER NJ, HOLDSWORTH SR & JOHNSON PDR. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:132-139.
33. JOHNSTON A, GUDJONSSON JE, SIGMUNDSDOTTIR H, LUDVIKSSON BR & VALDIMARSSON H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol*. 2005;114:154-163.
34. KAUFMANN SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001; 1:20-30.
35. KAUFMANN SHE. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis* 2003; 83: 86-90.
36. KAWASHIMA M & MIOSSEC P. Effect of treatment of rheumatoid arthritis with infliximab on IFN gamma, IL4, T-bet, and GATA-3 expression: link with improvement of systemic inflammation and disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64:415-418.
37. KHADER SA, PEARL JE, SAKAMOTO K, GILMARTIN L, BELL GK, JELLEY-GIBBS DM, GHILARDI N, DE SAUVAGE F & COOPER AM. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* .2005;175:788-795.

38. KLIPPEL JH & DIEPPE PA. Rheumatology. Mosby, 2000; Vol. 1, Seção 5.
39. KOHM AP, CARPENTIER PA, ANGER HA & MILLER SD. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2002; 169: 4712-4716.
40. KOLLS JK & LINDEN A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity 2004; 21:467-476.
41. LANGRISH CL, CHEN Y, BLUMENSCHNEIN WM, MATTSON J, BASHAM B, SEDGWICK JD, MCCLANAHAN T, KASTELEIN RA & CUA DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med. 2005; 17;201:233-240.
42. LANGRISH CL, MCKENZIE BS, WILSON NJ, MALEFYT RW, KASTELEIN RA & CUA DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. Immunol Rev. 2004; 202:96-105.
43. LARSEN CG, THOMSEN MK, GESSER B, THOMSEN PD, DELEURAN BW, NOWAK J, SKODT V, THOMSEN HK, DELEURAN M & THESTRUP-PEDERSEN K. The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. J Immunol. 1995; 155:2151-2157.
44. LAURINDO IMM, PINHEIRO GRC, XIMENES AC, BERTOLO MBB, XAVIER RM, GIORGI RDN, CICONELLI RM, RADOMINSKI SC, LIMA FAC, BATISTELA LM & ALENCAR P. Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. Rev Bras Reumatol. 2002; 42:355-361.



45. LEE E & HOLZMAN RS. Evolution and current use of the tuberculin test. Clin Infect Dis. 2002; 34:365-370.
46. LUBBERTS E, SCHWARZENBERGER P, HUANG W, SCHURR JR, PESCHON JJ, VAN DEN BERG WB, KOLLS JK. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. J Immunol. 2005;175:3360-3368.
47. MANDELL GL, BENNETT JE & DOLIN R. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, 2004; Seção 7, Unid. 248.
48. MANGINI C & MELO FAF. Atrite reumatóide, terapia imunossupressora e tuberculose. Rev Bras Reumatol. 2003; 43: XI-XV.
49. MIRANDA-CARÚS ME, Balsa A, BENITO-MIGUEL M, AYALA CP & MARTÍN-MOLA E. IL-15 and the Initiation of Cell Contact-Dependent Synovial Fibroblast-T Lymphocyte Cross-Talk in Rheumatoid Arthritis: effect of methotrexate. J Immunol. 2004, 173: 1463–1476.
50. MUSTAFA AS, SHABAN FA, AL-ATTIYAH R, ABAL AT, EL-SHAMY AM, ANDERSEN P, OFTUNG F. Human Th1 cell lines recognize the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen and its peptides in association with frequently expressed HLA class II molecules. Scand J Immunol. 2003; 57:125-134.
51. NORTH RJ & JUNG Y. Immunity to tuberculosis. Ann Rev Immunol. 2004; 22:599-623.
52. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) – Tuberculosis. 2005. <http://www.who.int/tb/en/>

53. OTTENHOFF TH, VERRECK FA, HOEVE MA & VAN DE VOSSE E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis* 2005; 85:53-64.
54. PAI M. Alternatives to the tuberculin skin test: Interferon- $\gamma$  assays in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J Med Microbiol.* 2005; 23:151-158.
55. PALA P, HUSSELL T & OPENSHAW PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth.* 2000; 243:107-124.
56. PARKS DR, HERZENBERG A & HERZENBERG LA. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. *Fundamental Immunology* 1999; Cap. 29:781-802.
57. PINHEIRO, GRC. Rheumatoid arthritis and tuberculosis in the tumor necrosis factor inhibitors era: observations from Brazil. *J Clin Rheumatol.* 2005; 11:1-2.
58. POLLARD L & CHOY E. Rheumatoid arthritis: non-tumor necrosis factor targets. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; 17:242-246.
59. PONCE DE LEON D, ACEVEDO-VASQUEZ E, SANCHEZ-TORRES A, CUCHO M, ALFARO J, PERICH R, PASTOR C, HARRISON J & SANCHEZ-SCHWARTZ C. Attenuated response to purified protein derivative in patients with rheumatoid arthritis: study in a population with a high prevalence of tuberculosis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 1360-1361.
60. PROGRAMA DE CONTROLE DE TUBERCULOSE (PCT). Boletim informativo. Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (SES-RJ), 2005; 19p.

61. RENSHAW PS, LIGHTBODY KL, VEVERKA V, MUSKETT FW, KELLY G, FRENKIEL TA, GORDON SV, HEWINSON RG, BURKE B, NORMAN J, WILLIAMSON RA & CARR MD. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J* 2005; 24:2491-2498.
62. RIVAS-SANTIAGO B, VIEYRA-REYES P & ARAUJO Z. Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review. *Invest Clin*. 2005; 46: 391-412.
63. ROBBINS SL & COTRAN RS. *Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, 2004; Cap. 27.
64. ROBINSON JP. *Current protocols in cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., 1997 e atualizações, Cap. 6, Unid. 6.5.
65. ROOK GAW, DHEDA K & ZUMLA A. Immune response to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:661-667.
66. SANCHO D, GÓMEZ M & SÁNCHEZ-MADRID F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 2005; 26:136-140.
67. SAYAH A & ENGLISH 3<sup>RD</sup> JC . Rheumatoid arthritis: a review of the cutaneous manifestations. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 53:191-209.
68. SCARPELLINI P, TASCA S, GALLI L, BERETTA A, LAZZARIN A, FORTIS C. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3469-3474.

69. SCHIRMER M, VALLEJO AN, WEYAND CM & GORONZY JJ. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol.* 1998;16:1018-1025.
70. SENNA ER, BARROS ALP, SILVA EO, COSTA IF, PEREIRA LVB, CICONELLI RM & FERRAZ MB. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol.* 2004; 31:594-596.
71. SESTER M, SESTER U, CLAUER P, HEINE G, MACK U, MOLL T, SYBRECHT GW, LALVANI A & KÖHLER H. Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kid Int.* 2004; 65:1826-1834.
72. SILVA TL, REIS A, HEWITT C & ROSEIRO JC. Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Bol Biotec.* 2005; 32-40.
73. STEGELMAN F, BASTIAN M, SWOBADA K, BHAT R, KIESSLER V, KRENSKY AM, ROELLINGHOFF M, MODLIN RL & STENGER S. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2005; 175: 7474-7483.
74. TAYLOR GM, STEWART GR, COOKE M, CHAPLIN S, LADVA S, KIRKUP J, PALMER S & YOUNG DB. Koch's Bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology* 2003; 149: 3213 - 3220.
75. YOSHINAGA Y, KANAMORI T, OTA Y, MIYOSHI T, KAGAWA H & YAMAMURA M. Clinical characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* infection among rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol.* 2004; 14:143-148.

76. WEYAND CM, FULBRIGHT JW & GORONZY JJ. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp Gerontol.* 2003; 38:833-841.
77. WHALEN CC. Diagnosis of latent tuberculosis infection: measure for measure. *JAMA* 2005; 293:2785-2787.
78. ZOLA H. Immunological applications of flow cytometry. *J Immunol Meth.* 2000; 243:1-2.

#### **LEITURA RELACIONADA**

- a. ARAÚJO LZS. Aspectos éticos da pesquisa científica. *Pesq Odontol Brás* 2003; 17(Supl 1): 57-63.
- b. BASTOS LR, FERNADES LM, PAIXÃO L & DELUIZ N. Manual para a elaboração de projetos e relatórios de pesquisa, teses, dissertações e monografias. Ed. Guanabara Koogan, 4<sup>a</sup> edição, 1993, 96p.
- c. RESOLUÇÃO 196. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. 1996. CNS.
- d. VIEIRA S. Introdução à bioestatística. Editora Campus. 1995; 216p.

***ANEXOS***

---

## PROCOLO EXPERIMENTAL I

### OBJETIVO:

Análise da produção intracelular e secreção de IFN $\gamma$  por linfócitos T, de sangue periférico, específicos para peptídeos do *M. tuberculosis*, por citometria de fluxo.

### MATERIAL:

Seringas de 20 mL	Placa de Cultura de fundo em "U", 96 poços
Tubos de Centrifugação de 50 e 15mL	Ponteiras grandes e pequenas
Pipetas de 5 e 25 mL	Tubos para citometria

### REAGENTES:

#### Soluções:

- Heparina Sódica;
- Ficoll-hipaque;
- PBS: Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fostato de sódio dibásico, fostato de potássio monobásico e água deionizada;
- Soro fetal bovino (SFB);
- Meio de cultura completo (MCC): RPMI 1640, L-glu, hepes, PEES, bicarb. de sódio com 10% de SFB;
- Paraformaldeído 1%;
- Brefeldina A: estoque em etanol;
- Solução de Permeabilização (SP): diluir o estoque com água deionizada 10x (1:10), imediatamente antes de usar (solução de uso - 1x);
- EDTA: diluído a [0,02%] em PBS;
- Tampão de lavagem 1: PBS/ 0,1% BSA/ 0,1% azida sódica;
- Tampão de lavagem 2: PBS/0,1% azida sódica.

#### Anticorpos:

- $\alpha$ CD3-FITC, pingar 2 $\mu$ L/poço (calibração);
- $\alpha$ CD3-PE, pingar 2 $\mu$ L/poço (calibração);
- $\alpha$ CD3-Cy, pingar 2 $\mu$ L/poço (calibração);
- $\alpha$ CD3-APC, pingar 2 $\mu$ L/poço (calibração);
- $\gamma$ 2a-FITC/  $\gamma$  1-PE/CD4- PerCP.Cy (isotipo – Is/CD4), pingar 2,5  $\mu$ L/poço;
- $\gamma$  2a-FITC/  $\gamma$  1-PE/CD8- PerCP.Cy/CD3-APC (isotipo – Is/CD8), pingar 2,5  $\mu$ L/poço;
- $\alpha$ IFN $\gamma$ -FITC/CD69-PE/CD4- PerCP.Cy (IFN/CD69/CD4), pingar 2,5  $\mu$ L/poço;
- $\alpha$ IFN $\gamma$ -FITC/CD69-PE/CD8- PerCP.Cy/CD3-APC (IFN/CD69/CD8), pingar 2,5  $\mu$ L/poço.

#### Estímulos:

- SEB: Estoque 1 mg/mL – final 1  $\mu$ g/mL – Sol. de uso de 100  $\mu$ g/mL → Pingar 2  $\mu$ l da Sol. de uso/ poço;
- PPD: Estoque 1 mg/mL – final no poço 10  $\mu$ g/mL → Pingar 2 $\mu$ L/poço;
- PA (ESAT-6): Estoque 100 $\mu$ g/mL – final no poço 10 $\mu$ g/mL → Pingar 20 $\mu$ L/poço;

#### Co-estímulos:

- Anti-CD28: Estoque 100  $\mu$ g/mL – final no poço 1  $\mu$ g/mL → Pingar 2  $\mu$ L;
- Anti-CD49d: Estoque 100  $\mu$ g/mL – final no poço 1  $\mu$ g/mL → Pingar 2  $\mu$ L.

### MÉTODO:

#### Etapa 1: Obtenção das células mononucleares de sangue (CMS)

- Colher 40mL de sangue periférico em seringa com heparina (400 $\mu$ L → 40mL);

2. Misturar o sangue em proporção 1:2 com PBS fresco;
3. Adicionar cuidadosamente 20mL de sangue/PBS em tubo com 15mL de ficoll-hipaque em temperatura ambiente;
4. Centrifugar a 2.000 RPM, 30 minutos, 25° C, sem freio;
5. Coletar as CMS localizadas na interface entre e ficol-hipaque e o plasma;
6. Centrifugar as CMS por 10 minutos, 1.500 RPM, 4° C;
7. Desprezar o SN e ressuspender em 10mL de PBS 1% de SFB;
8. Centrifugar as CMS por 10 minutos, 1.200 RPM, 4° C;
9. Repetir passos 7 e 6, respectivamente;
10. Desprezar o SN e ressuspender em 5mL de MCC;
11. Contar as CMS usando o método de exclusão com azul de tripan.

#### **Etapa 2A: Obtenção de Sobrenadante (SN) para o ELISA**

1. Concentrar as CMS com MCC para  $10 \times 10^6/10$  mL e pingar 200 $\mu$ L/ $1 \times 10^5$ /poço
2. Adicionar os estímulos de acordo com o esquema 1 (anexo);
3. Incubar em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, à 37° C por 5 dias;
4. Centrifugar por 1 minuto, 500RPM, a 25° C;
5. Coletar os SN e armazenar a -20° C.

#### **Etapa 2B: Avaliação de citocina intracelular em CMS antígeno-específicas**

1. Concentrar as CMS com MCC para  $25 \times 10^6/10$  ml e pingar 200 $\mu$ L/ $5 \times 10^5$ /poço
2. Centrifugar por 1 minuto, 500RPM, a 5° C;
3. Adicionar co-estímulos (ce) anti-CD28 e anti-CD49d de acordo com o **esquema 2** (anexo);
4. Adicionar estímulos de acordo com o **esquema 2** (anexo);
5. Incubar por 1 hora e adicionar 2  $\mu$ L de Brefeldina A  
\* *Os pontos sem estímulo também levam Brefeldina A;*
6. Incubar em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, à 37° C por mais 5 horas (6 horas totais de incubação).

#### **Etapa 3B:**

1. Centrifugar a placa por 5 minutos, 1.700 RPM, 4° C;
2. Ressuspender em 200 $\mu$ L de PBS gelado;
3. Repetir passo 1;
4. Ressuspender em 200 $\mu$ L de PBS contendo 0,02% de EDTA;
5. Misturar cuidadosamente no vórtex e incubar por 15 min em temperatura ambiente;
6. Repetir passo 1, 2 e 1, respectivamente;
7. Ressuspender em 200  $\mu$ L de Solução de Permeabilização 1x;
8. Misturar bem e cuidadosamente no vórtex e incubar por 10 min, temperatura ambiente, no escuro;
9. Repetir passo 1;
10. Ressuspender em 200 $\mu$ L de tampão de lavagem 1;
11. Repetir passo 1;
12. Repetir passos 10 e 1;
13. Desprezar SN e pingar os anticorpos para marcação, de acordo com o esquema 2 (anexo);
14. Incubar por 30 minutos, a 4° C, no escuro;
15. Repetir passos 10 e 1;
16. Ressuspender em 200 $\mu$ L de tampão de lavagem 2;
17. Repetir passo 1;
18. Ressuspender em 150  $\mu$ L de paraformaldeído 1 %;
19. Transferir para tubos de citometria enumerados preenchidos com 150  $\mu$ L de paraformaldeído 1%;



20. Manter na geladeira até a aquisição que deve ser feita no máximo em de 24 horas.

(Anexo) Esquema 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	SE 1	SE 1	SE 1			PPD 3	PPD 3	PPD 3		
<b>B</b>										
<b>C</b>	SEB 2	SEB 2	SEB 2			PA 4	PA 4	PA 4		
<b>D</b>										

(Anexo) Esquema 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>A</b>	SE NC 1	SE NC 1	SE CD3 FITC 2	SE CD3 PE 3	SE CD3 Cy 4	SE CD3 APC 5			
<b>B</b>									
<b>C</b>	SE Is/CD4 6	SE Is/CD4 6	SE IFN/CD4 7	SE IFN/CD4 7		SE Is/CD8 16	SE Is/CD8 16	SE IFN/CD8 17	SE IFN/CD8 17
<b>D</b>	SE +ce Is/CD4 8	SE +ce Is/CD4 8	SE +ce IFN/CD4 9	SE +ce IFN/CD4 9		SE +ce Is/CD8 18	SE +ce Is/CD8 18	SE +ce IFN/CD8 19	SE +ce IFN/CD8 19
<b>E</b>	SEB +ce Is/CD4 10	SEB +ce Is/CD4 10	SEB +ce IFN/CD4 11	SEB +ce IFN/CD4 11		SEB +ce Is/CD8 20	SEB +ce Is/CD8 20	SEB +ce IFN/CD8 21	SEB +ce IFN/CD8 21
<b>F</b>	PPD +ce Is/CD4 12	PPD +ce Is/CD4 12	PPD +ce IFN/CD4 13	PPD +ce IFN/CD4 13		PPD +ce Is/CD8 22	PPD +ce Is/CD8 22	PPD +ce IFN/CD8 23	PPD +ce IFN/CD8 23
<b>G</b>	PA +ce Is/CD4 14	PA +ce Is/CD4 14	PA +ce IFN/CD4 15	PA +ce IFN/CD4 15		PA +ce Is/CD8 24	PA +ce Is/CD8 24	PA +ce IFN/CD8 25	PA +ce IFN/CD8 25

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL II

### OBJETIVO:

Avaliar a secreção de IFN $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue em resposta a peptídeos do *M. tuberculosis*, através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

### MATERIAL:

Seringas de 20 mL	Placa de Cultura de fundo em "U"
Tubos de Centrifugação de 50 e 15mL	Placa de ELISA com 96 poços
Pipetas de 5 e 25 mL	Ponteiras grandes e pequenas

### REAGENTES:

#### Soluções:

1. Heparina Sódica;
2. Ficoll-hipaque;
3. PBS: Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fostato de sódio dibásico, fostato de potássio monobásico e água deionizada;
4. Soro fetal bovino (SFB);
5. Meio de cultura completo (MCC): RPMI, L-glu, hepes, PEES, bicarb. de sódio com 10% de SFB;
6. Albumina de Soro Bovino (BSA);
7. Tampão carbonato-bicarbonato: 4mL de carbonato de sódio anidro a 0,2M (Sigma)/ 46mL de bicarbonato de sódio a 0,2M (Sigma), ambos diluídos em água deionizada;
8. Tampão de bloqueio: PBS/ 1% BSA;
9. Tampão de lavagem: PBS/ 0,05% Tween 20 (Gibco-BRL);
10. Solução de Diluição: PBS/ 1% BSA/ 0,05% de Tween 20;
11. Solução padrão: sol. de uso - diluído nas concentrações de 4000 a 62,5pg/mL, pingar 50 $\mu$ L/poço;
12. Substrato TMB: 5mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 5mL Tetrametilbenzidina;
13. Ácido sulfúrico 2,5N.

#### Anticorpos:

1. Anti-IFN $\gamma$  humano de captura [4 $\mu$ g/mL]: sol. de uso – diluída 500x em tampão carbonato-bicarbonato, pingar 50 $\mu$ L/poço;
2. Anti-IFN $\gamma$  humano de detecção biotilado [100ng/mL]: sol. de uso - diluída 250x em tampão de bloqueio, pingar 50 $\mu$ L/poço;
3. Estreptoavidina-HRP (SAv-HRP) [diluída 1000x do estoque]: sol. de uso - diluída 1000x em tampão de bloqueio, pingar 100 $\mu$ L/poço.

### MÉTODO:

1. Realizar toda **Etapa 1** do PROTOCOLO EXPERIMENTAL I;
2. Realizar toda **Etapa 2A** do PROTOCOLO EXPERIMENTAL I;
3. Pingar 50 $\mu$ L de anti-IFN $\gamma$  humano de captura (sol. de uso) por poço;
4. Incubar overnight a 4° C;
5. Adicionar 200 $\mu$ L/poço de tampão de bloqueio;
6. Incubar por 1 h e meia em temperatura ambiente;
7. Lavar a placa 3x com 100 $\mu$ L/poço de tampão de lavagem;
8. Pingar 50 $\mu$ L/poço da solução padrão (nas diluições) e 50 $\mu$ L/poço dos SNs das culturas;
9. Incubar por 2 h em temperatura ambiente;
10. Lavar a placa 4x com 100 $\mu$ L/poço de tampão de lavagem;
11. Pingar 50 $\mu$ L/poço do anti-IFN $\gamma$  humano de detecção biotilado;

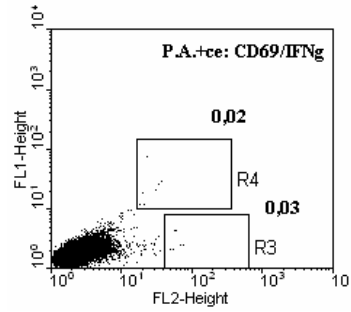
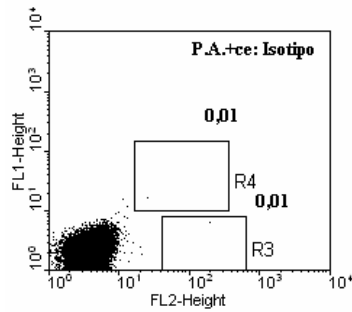
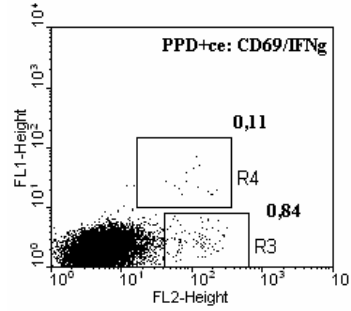
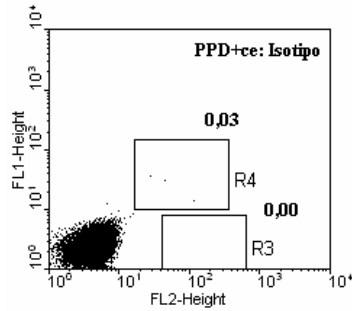
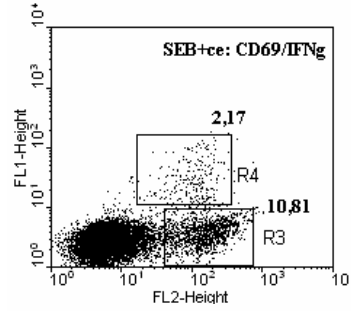
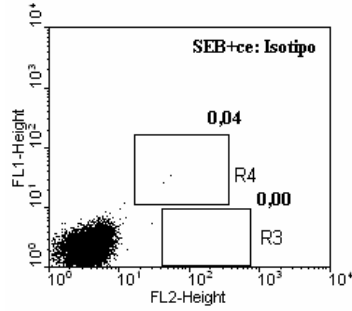
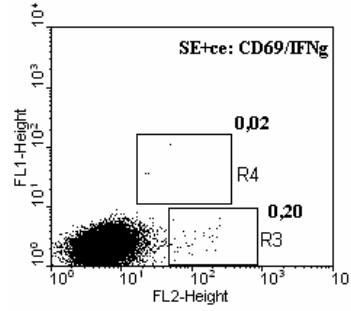
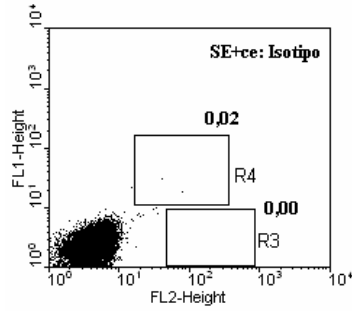
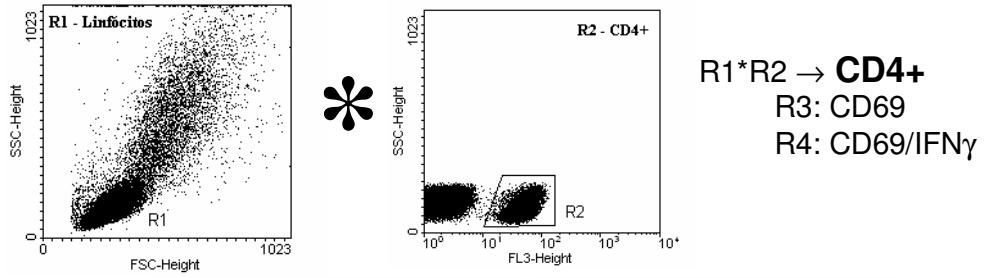
12. Incubar por 1 h em temperatura ambiente;
13. Lavar a placa 4x com 100µL/poço de tampão de lavagem;
14. Pingar 100µL/poço de SAv-HRP (sol. de uso);
15. Incubar por 30min em temperatura ambiente;
16. Lavar a placa 5x com 100µL/poço de tampão de lavagem;
17. Pingar 100µL/poço de substrato TMB;
18. Incubar por 5min em temperatura ambiente;
19. Pingar 50µL/poço de ácido sulfúrico 2,5N;
20. Levar a placa para o leitor de ELISA (filtro de 450nm).

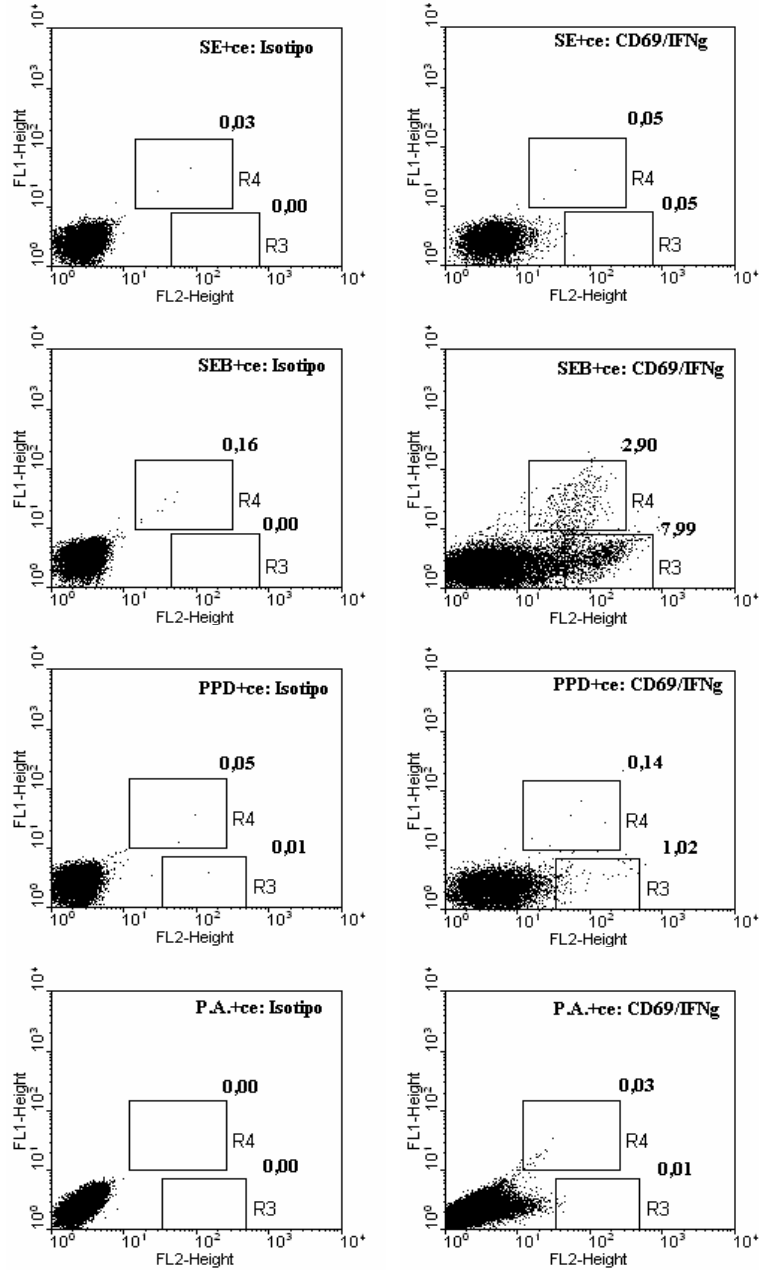
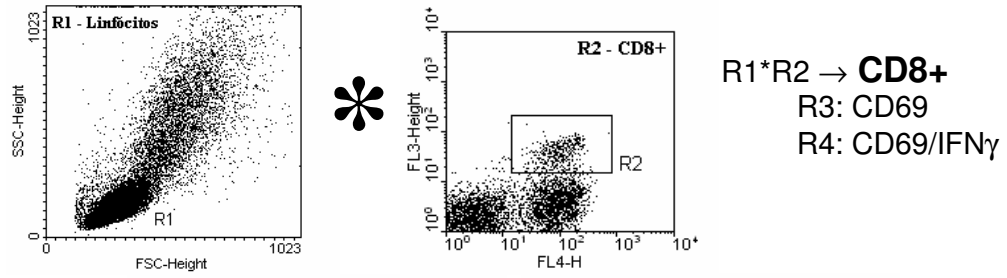
(Anexo) Esquema da Placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blank	Blank	4000	4000	2000	2000	1000	1000	500	500	250	250
<b>B</b>	125	125	62,5	62,5								
<b>C</b>	SE P1	SE P1	SEB P1	SEB P1	PPD P1	PPD P1	PA P1	PA P1			SE P3	SE P3
<b>D</b>	SEB P3	SEB P3	PPD P3	PPD P3	PA P3	PA P3			SE P4	SE P4	SEB P4	SEB P4
<b>E</b>	PPD P4	PPD P4	PA P4	PA P4			SE P5	SE P5	SEB P5	SEB P5	PPD P5	PPD P5
<b>F</b>	PA P5	PA P5			SE P6	SE P6	SEB P6	SEB P6	PPD P6	PPD P6	PA P6	PA P6
<b>G</b>	SE P7	SE P7	SEB P7	SEB P7	PPD P7	PPD P7	PA P7	PA P7			SE P8	SE P8
<b>H</b>	SEB P8	SEB P8	PPD P8	PPD P8	PA P8	PA P8						

*\*Os SNs do paciente 2 não foram dosados.*

# ANÁLISE DO ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO – *representativa* (P8)





**TABELAS COM AS PORCENTAGENS OBTIDAS NOS ENSAIOS DE  
CITOMETRIA DE FLUXO**

\*Resultado final: F% = Esp% - Iso%

Paciente 1							
CD4/CD69				CD8/CD69			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0,79</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,02</b>
	Espec.	0,79			Espec.	0,02	
SEB + ce	Isotipo	0	<b>33,26</b>	SEB + ce	Isotipo	0,07	<b>13,34</b>
	Espec.	33,26			Espec.	13,41	
PPD + ce	Isotipo	0,12	<b>3,52</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>0,73</b>
	Espec.	3,64			Espec.	0,74	
PA + ce	Isotipo	0,94	<b>7,49</b>	PA + ce	Isotipo	0,02	<b>0,77</b>
	Espec.	8,43			Espec.	0,79	
CD4/CD69/IFN $\gamma$				CD8/CD69/IFN $\gamma$			
SE + ce	Isotipo	0,04	<b>0,01</b>	SE + ce	Isotipo	0,03	<b>0,02</b>
	Espec.	0,05			Espec.	0,05	
SEB + ce	Isotipo	0,03	<b>4,51</b>	SEB + ce	Isotipo	0,03	<b>3,40</b>
	Espec.	4,54			Espec.	3,43	
PPD + ce	Isotipo	0,05	<b>0,42</b>	PPD + ce	Isotipo	0,04	<b>0,02</b>
	Espec.	0,47			Espec.	0,06	
PA + ce	Isotipo	0,02	<b>0,08</b>	PA + ce	Isotipo	0,02	<b>0,04</b>
	Espec.	0,10			Espec.	0,06	
Paciente 2							
CD4/CD69				CD8/CD69			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0,23</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,46</b>
	Espec.	0,23			Espec.	0,46	
SEB + ce	Isotipo	0	<b>44,43</b>	SEB + ce	Isotipo	0,01	<b>29,57</b>
	Espec.	44,23			Espec.	29,58	
PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>12,50</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>5,56</b>
	Espec.	12,51			Espec.	5,57	
PA + ce	Isotipo	0,11	<b>5,82</b>	PA + ce	Isotipo	0,01	<b>6,01</b>
	Espec.	5,93			Espec.	6,02	
CD4/CD69/IFN $\gamma$				CD8/CD69/IFN $\gamma$			
SE + ce	Isotipo	0,02	<b>0</b>	SE + ce	Isotipo	0,02	<b>0,02</b>
	Espec.	0,02			Espec.	0,04	
SEB + ce	Isotipo	0,02	<b>4,82</b>	SEB + ce	Isotipo	0,09	<b>7,44</b>
	Espec.	4,84			Espec.	7,53	
PPD + ce	Isotipo	0,06	<b>0,88</b>	PPD + ce	Isotipo	0,06	<b>0,39</b>
	Espec.	0,94			Espec.	0,45	
PA + ce	Isotipo	0,03	<b>0,01</b>	PA + ce	Isotipo	0,11	<b>0,02</b>
	Espec.	0,04			Espec.	0,13	
Paciente 3							
CD4/CD69				CD8/CD69			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0,71</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0</b>
	Espec.	0,71			Espec.	0	
SEB + ce	Isotipo	0	<b>22,45</b>	SEB + ce	Isotipo	0	<b>7,90</b>
	Espec.	22,45			Espec.	7,90	
PPD + ce	Isotipo	0,20	<b>0,94</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>1,29</b>
	Espec.	1,14			Espec.	1,30	
PA + ce	Isotipo	0,01	<b>1,54</b>	PA + ce	Isotipo	0	<b>0,16</b>
	Espec.	1,55			Espec.	0,16	
CD4/CD69/IFN $\gamma$				CD8/CD69/IFN $\gamma$			
SE + ce	Isotipo	0,01	<b>0,02</b>	SE + ce	Isotipo	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>
	Espec.	0,03			Espec.	0,12	

SEB + ce	Isotipo	0,04	<b>1,78</b>	SEB + ce	Isotipo	0,06	<b>7,24</b>
	Espec.	1,82		SEB + ce	Espec.	7,30	
PPD + ce	Isotipo	0,04	<b>0,09</b>	PPD + ce	Isotipo	0,04	<b>1,36</b>
	Espec.	0,13		PPD + ce	Espec.	1,40	
PA + ce	Isotipo	0,04	<b>0</b>	PA + ce	Isotipo	0,12	<b>0</b>
	Espec.	0,02		PA + ce	Espec.	0,10	
<b>Paciente 4</b>							
<b>CD4/CD69</b>				<b>CD8/CD69</b>			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,07</b>
	Espec.	0		SE + ce	Espec.	0,07	
SEB + ce	Isotipo	0	<b>14,40</b>	SEB + ce	Isotipo	0	<b>2,09</b>
	Espec.	14,40		SEB + ce	Espec.	2,09	
PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>1,61</b>	PPD + ce	Isotipo	0	<b>0,28</b>
	Espec.	1,62		PPD + ce	Espec.	0,28	
PA + ce	Isotipo	0	<b>2,95</b>	PA + ce	Isotipo	0	<b>0,75</b>
	Espec.	2,95		PA + ce	Espec.	0,75	
<b>CD4/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>				<b>CD8/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>			
SE + ce	Isotipo	0,01	<b>0,04</b>	SE + ce	Isotipo	0,06	<b>0</b>
	Espec.	0,05		SE + ce	Espec.	0,02	
SEB + ce	Isotipo	0,04	<b>1,14</b>	SEB + ce	Isotipo	0,07	<b>5,39</b>
	Espec.	1,18		SEB + ce	Espec.	5,46	
PPD + ce	Isotipo	0,05	<b>0,08</b>	PPD + ce	Isotipo	0,06	<b>0</b>
	Espec.	0,13		PPD + ce	Espec.	0,05	
PA + ce	Isotipo	0,03	<b>0</b>	PA + ce	Isotipo	0,01	<b>0,04</b>
	Espec.	0,02		PA + ce	Espec.	0,05	
<b>Paciente 5</b>							
<b>CD4/CD69</b>				<b>CD8/CD69</b>			
SE + ce	Isotipo	0,01	<b>0,61</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,12</b>
	Espec.	0,62		SE + ce	Espec.	0,12	
SEB + ce	Isotipo	0	<b>15,61</b>	SEB + ce	Isotipo	0	<b>10</b>
	Espec.	15,61		SEB + ce	Espec.	10	
PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>3,92</b>	PPD + ce	Isotipo	0,02	<b>0,53</b>
	Espec.	3,93		PPD + ce	Espec.	0,55	
PA + ce	Isotipo	0	<b>7,05</b>	PA + ce	Isotipo	0	<b>0</b>
	Espec.	7,05		PA + ce	Espec.	0	
<b>CD4/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>				<b>CD8/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>			
SE + ce	Isotipo	0,13	<b>0,09</b>	SE + ce	Isotipo	0,16	<b>0</b>
	Espec.	0,24		SE + ce	Espec.	0,04	
SEB + ce	Isotipo	0,24	<b>1,01</b>	SEB + ce	Isotipo	0,10	<b>1,35</b>
	Espec.	1,25		SEB + ce	Espec.	1,45	
PPD + ce	Isotipo	0,10	<b>0,07</b>	PPD + ce	Isotipo	0,25	<b>0</b>
	Espec.	0,17		PPD + ce	Espec.	0,15	
PA + ce	Isotipo	0,05	<b>0,24</b>	PA + ce	Isotipo	0,02	<b>1,28</b>
	Espec.	0,29		PA + ce	Espec.	1,30	
<b>Paciente 6</b>							
<b>CD4/CD69</b>				<b>CD8/CD69</b>			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0,93</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,05</b>
	Espec.	0,93		SE + ce	Espec.	0,05	
SEB + ce	Isotipo	0,05	<b>30,25</b>	SEB + ce	Isotipo	0,01	<b>28,33</b>
	Espec.	30,30		SEB + ce	Espec.	28,34	
PPD + ce	Isotipo	0,19	<b>3,06</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>1,62</b>
	Espec.	3,25		PPD + ce	Espec.	1,63	
PA + ce	Isotipo	0,23	<b>2,39</b>	PA + ce	Isotipo	0,01	<b>3,39</b>
	Espec.	2,62		PA + ce	Espec.	3,40	
<b>CD4/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>				<b>CD8/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>			

SE + ce	Isotipo	0	<b>0</b>	SE + ce	Isotipo	0,01	<b>0</b>
	Espec.	0			Espec.	0,01	
SEB + ce	Isotipo	0,18	<b>1,77</b>	SEB + ce	Isotipo	0	<b>2,35</b>
	Espec.	1,95			Espec.	2,35	
PPD + ce	Isotipo	0,02	<b>0,07</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>0,19</b>
	Espec.	0,09			Espec.	0,20	
PA + ce	Isotipo	0,01	<b>0,68</b>	PA + ce	Isotipo	0,02	<b>0</b>
	Espec.	0,69			Espec.	0,02	
<b>Paciente 7</b>							
<b>CD4/CD69</b>				<b>CD8/CD69</b>			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0,15</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,91</b>
	Espec.	0,15			Espec.	0,91	
SEB + ce	Isotipo	0,01	<b>28,03</b>	SEB + ce	Isotipo	0	<b>18,83</b>
	Espec.	28,04			Espec.	18,83	
PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>3,26</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>5,92</b>
	Espec.	3,27			Espec.	5,93	
PA + ce	Isotipo	0	<b>1,14</b>	PA + ce	Isotipo	0	<b>2,91</b>
	Espec.	1,14			Espec.	2,91	
<b>CD4/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>				<b>CD8/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>			
SE + ce	Isotipo	0,03	<b>0</b>	SE + ce	Isotipo	0,02	<b>0,01</b>
	Espec.	0,03			Espec.	0,03	
SEB + ce	Isotipo	0,05	<b>7,97</b>	SEB + ce	Isotipo	0,39	<b>8,68</b>
	Espec.	8,02			Espec.	9,07	
PPD + ce	Isotipo	0,04	<b>0,76</b>	PPD + ce	Isotipo	0,12	<b>1,63</b>
	Espec.	0,80			Espec.	1,75	
PA + ce	Isotipo	0,01	<b>0,01</b>	PA + ce	Isotipo	0,03	<b>0</b>
	Espec.	0,02			Espec.	0,03	
<b>Paciente 8</b>							
<b>CD4/CD69</b>				<b>CD8/CD69</b>			
SE + ce	Isotipo	0	<b>0,20</b>	SE + ce	Isotipo	0	<b>0,05</b>
	Espec.	0,20			Espec.	0,05	
SEB + ce	Isotipo	0	<b>16,81</b>	SEB + ce	Isotipo	0	<b>7,99</b>
	Espec.	16,81			Espec.	7,99	
PPD + ce	Isotipo	0	<b>0,84</b>	PPD + ce	Isotipo	0,01	<b>1,01</b>
	Espec.	0,84			Espec.	1,02	
PA + ce	Isotipo	0,01	<b>0,22</b>	PA + ce	Isotipo	0	<b>0,01</b>
	Espec.	0,23			Espec.	0,01	
<b>CD4/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>				<b>CD8/CD69/IFN<math>\gamma</math></b>			
SE + ce	Isotipo	0,02	<b>0</b>	SE + ce	Isotipo	0,03	<b>0,02</b>
	Espec.	0,02			Espec.	0,05	
SEB + ce	Isotipo	0,04	<b>2,53</b>	SEB + ce	Isotipo	0,16	<b>2,74</b>
	Espec.	2,57			Espec.	2,90	
PPD + ce	Isotipo	0,03	<b>0,07</b>	PPD + ce	Isotipo	0,05	<b>0,09</b>
	Espec.	0,11			Espec.	0,14	
PA + ce	Isotipo	0,01	<b>0,01</b>	PA + ce	Isotipo	0	<b>0,03</b>
	Espec.	0,02			Espec.	0,03	

### Medianas:

	CD69/CD4	CD69/CD8	CD69/CD4/IFN $\gamma$	CD69/CD8/IFN $\gamma$
<b>SE + ce</b>	0,42	0,06	0,01	0,01
<b>SEB + ce</b>	25,24	16,08	2,1	4,3
<b>PPD + ce</b>	3,16	1,15	0,07	0,14
<b>PA + ce</b>	2,67	0,76	0,01	0,02



## TABELAS COM OS VALORES DE IFN $\gamma$ OBTIDOS NOS ENSAIOS DE ELISA

*Abs.m = Média das absorvâncias das duplicatas;  
 F.Dil = fator de diluição usado durante o ensaio;  
 Concentração IFN $\gamma$  (pg/mL) = Abs/B (obtido na regressão linear da curva padrão);  
 Cut-off de positividade: 125 pg/mL*

Est.	Abs.m/B	F.Dil	[ ] IFN $\gamma$	Est.	Abs.m/B	F.Dil	[ ] IFN $\gamma$
<b>Paciente 1</b>				<b>Paciente 6</b>			
SE	2,5	2	<b>5</b>	SE	0	2	<b>0</b>
SEB	83	100	<b>8300</b>	SEB	34	100	<b>3400</b>
PPD	18	100	<b>1800</b>	PPD	6,6	100	<b>660</b>
PA	187,5	2	<b>375</b>	PA	413	2	<b>826</b>
<b>Paciente 3</b>				<b>Paciente 7</b>			
SE	12,5	2	<b>25</b>	SE	57	2	<b>114</b>
SEB	38,1	100	<b>3810</b>	SEB	73,4	100	<b>7340</b>
PPD	30,7	100	<b>3070</b>	PPD	19,7	100	<b>1970</b>
PA	745	2	<b>1490</b>	PA	1147	2	<b>2294</b>
<b>Paciente 4</b>				<b>Paciente 8</b>			
SE	25	2	<b>50</b>	SE	3,4	2	<b>6,8</b>
SEB	78,5	100	<b>7850</b>	SEB	47	100	<b>4700</b>
PPD	39,6	100	<b>3960</b>	PPD	22,1	100	<b>2210</b>
PA	72,5	2	<b>145</b>	PA	124	2	<b>248</b>
<b>Paciente 5</b>							
SE	106	2	<b>212</b>				
SEB	98	100	<b>9800</b>				
PPD	40,2	100	<b>4020</b>				
PA	1327	2	<b>2654</b>				

## PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DE ESAT-6 (PA)

Além do PPD e SEB (controle positivo) foi usado neste trabalho um estímulo específico de *M. tuberculosis*, PA (mix of ESAT-6 Peptide Amino Acid Sequences), uma mistura de 9 peptídeos sintéticos (cada um com 20 aminoácidos) que formam a seqüência completa da molécula ESAT-6, como descrito na tabela abaixo:

Peptídeo* (posição)	Seqüência de Aminoácidos
p1 (1-20)	MTEQQWNFAGIEAAASAIQG
p2 (11-30)	IEAAASAIQGNVTSIHSLLD
p3 (21-40)	NVTSIHSLLDDEGKQSLTKLA
p4 (31-50)	EGKQSLTKLAAAWGGSGSEA
p5 (41-60)	AAWGGSGSEAYQGVQQKWDA
p6 (51-70)	YQGVQQKW DATATELNNALQ
p7 (61-80)	TATELNNALQNLARTISEAG
p8 (71-90)	NLARTISEAGQAMASTEAGNV
p9 (76-95) <sup>b</sup>	ISEAGQAMASTEAGNVTGMFA

\*Cada peptídeo na concentração de 1µg/mL, com concentração total de uso de 9µg/mL.

Fonte: Centro Médico da Universidade de Leiden, Leiden, Holanda

(Arend *et al.*, 2000)

## QUESTIONÁRIO ARTRITE REUMATÓIDE – TUBERCULOSE

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Reg: \_\_\_\_\_ Médico: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Protocolo AR: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Tempo de Artrite: \_\_\_\_\_ Doença Erosiva ( ) Sim ( ) Não

### 1. História Clínica

- ( ) História de tratamento anterior para tuberculose;
- ( ) História de quimioprofilaxia anterior para infecção tuberculosa;
- ( ) Contato intradomiciliar ou institucional com portadores de tuberculose;
  
- ( ) Sintomático (suspeita de Tb), quando: ( ) Tosse seca ou produtiva por 3 semanas ou mais; ( ) Febre vespertina; ( ) Sudorese noturna; ( ) Perda ponderal (>10% do peso ideal); ( ) inapetência; ( ) astenia.
  
- ( ) Teste tuberculínico (PPD) prévio. Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_
- ( ) Vacinação BCG

### 2. Doenças Associadas que predispõem à Tuberculose

- ( ) Não ( ) Sim, descrever:
- ( ) Diabetes; ( ) Cirrose; ( ) Alcoolismo; ( ) HIV; ( ) Fibrose pulmonar
- ( ) Insuf. Renal Crônica; ( ) Câncer; ( ) Leucemia / Linfoma; ( ) Gastrectomia;

### 3. Uso de medicamentos imunossupressores

- ( ) Não ( ) Sim, descrever:
- ( ) Prednisona: Dose média \_\_\_\_\_ mg/\_\_\_\_; Tempo \_\_\_\_\_ meses
- ( ) Metotrexato: Dose média \_\_\_\_\_ mg/\_\_\_\_; Tempo \_\_\_\_\_ meses
- ( ) \_\_\_\_\_: Dose média \_\_\_\_\_ mg/\_\_\_\_; Tempo \_\_\_\_\_ meses
- ( ) \_\_\_\_\_: Dose média \_\_\_\_\_ mg/\_\_\_\_; Tempo \_\_\_\_\_ meses

### 4. Raio-X de Tórax Data: \_\_\_/\_\_\_/2006

- ( ) Normal: não apresenta imagens patológicas em campos pleuro-pulmonares;
- ( ) Suspeito: imagem sugestiva de Tuberculose ativa ou de complexo primário;
- ( ) Seqüela: imagem sugestiva de lesão residual;
- ( ) Outras doenças: imagem sugestiva de pneumonia não tuberculosa (infecção bacteriana, micoses, abscessos, neoplasias ou alterações relacionadas a AR).

### 5. Observações:

---

---

---

## DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DO ESTUDO

<b>Paciente 1</b>		
Id: P1	Idade: 46 anos	Sexo: Feminino
Tempo/AR (em anos): 19	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Sim
Tratamento/semana: Metotrexato 10mg e Prednisona 15mg		PPD cutâneo: Reator (10 mm)

<b>Paciente 2</b>		
Id: P2	Idade: 40 anos	Sexo: Feminino
Tempo/AR (em anos): 3	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Não
Tratamento/semana: Metotrexato 10mg e DFZ 30mg		PPD cutâneo: Reator (5 mm)

<b>Paciente 3</b>		
Id: P3	Idade: 49 anos	Sexo: Feminino
Tempo/AR (em anos): 19	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Sim
Tratamento/semana: Metotrexato 15mg, Prednisona 15mg, Ácido Fólico 5mg e Paracetamol		PPD cutâneo: Não Reator

<b>Paciente 4</b>		
Id: P4	Idade: 44 anos	Sexo: Feminino
Tempo/AR (em anos): 15	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Sim
Tratamento/semana: Metotrexato 12,5mg, Prednisona 15mg, Cloroquina 250mg e Sulfasalazina 2000mg		PPD cutâneo: Não Reator

<b>Paciente 5</b>		
Id: P5	Idade: 53 anos	Sexo: Feminino
Tempo/AR (em anos): 8	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Sim
Tratamento/semana: Metotrexato 20mg, Prednisona 15mg, Ácido Fólico 5mg e Diclofenaco potássio		PPD cutâneo: Não Reator

<b>Paciente 6</b>		
Id: P6	Idade: 52 anos	Sexo: Masculino
Tempo/AR (em anos): 18	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Sim
Tratamento/semana: Metotrexato 15mg, Prednisona 15mg, Ácido Fólico 5mg, Atenolol, Sinvastatina e Rivotril		PPD cutâneo: Não Reator

<b>Paciente 7</b>		
Id: P7	Idade: 43 anos	Sexo: Masculino
Tempo/AR (em anos): 1	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Sim
Tratamento/semana: Metotrexato 0,7mL, Ácido Fólico 5mg e Diclofenaco postássio		PPD cutâneo: Não Reator

<b>Paciente 8</b>		
Id: P8	Idade: 33 anos	Sexo: Feminino
Tempo/AR (em anos): 4	Atividade da AR*: Sim	Doença Erosiva**: Não
Tratamento/semana: Metotrexato 15mg e Ácido Fólico 5mg		PPD cutâneo: Não Reator

\* Critérios para caracterização de atividade de doença:

- Presença de 6 (contagem de 66 articulações) ou mais articulações edemaciadas e 8 (contagem de 68 articulações) ou mais articulações dolorosas;
- Valor de proteína C reativa maior ou igual a 1mg/dL ou velocidade de hemossedimentação maior ou igual a 28mm/hr

\*\* Caracterização de doença erosiva: Considerou-se como doença erosiva quando observou-se a presença de alterações radiológicas compatíveis com erosão óssea, em radiografias de mãos ou pés, na incidência dorso – palmar e dorso – plantar, respectivamente.

(Klippel & Dieppe, 2000)

## TERMO DE CONSENTIMENTO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para participação no projeto: “Avaliação da resposta imune celular e humoral induzida por novos antígenos recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com Tuberculose”.

### Informações ao Voluntário

#### INFORMAÇÕES PRELIMINARES

Você, \_\_\_\_\_, está sendo convidado a participar como voluntário em um estudo, tendo o direito de estar ciente dos procedimentos que serão realizados.

A Tuberculose é uma doença infecciosa causada por uma micobactéria, o *Mycobacterium tuberculosis*, que atinge um grande número de pessoas no nosso Estado. O ser humano é o único ser vivo carreador desta bactéria e, portanto, o único transmissor da doença. O pulmão é o órgão mais freqüentemente atingido pela Tuberculose e sem tratamento a doença pode evoluir para a forma crônica ou óbito.

#### DESCRIÇÃO DA PESQUISA

- Objetivo: Estudar, a nível laboratorial, a resposta imunológica a antígenos da micobactéria *M. tuberculosis*.
- Descrição do estudo: Os pacientes, de ambos os sexos e de faixa etária entre 15-60 anos, serão recrutados no Setor de Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). Será feita uma coleta de sangue (cerca de 20-30mL) destes pacientes, além da solicitação de radiografia de tórax e teste tuberculínico (PPD cutâneo). Todos os indivíduos do estudo apresentarão uma ficha de acompanhamento na qual constarão dados como: nome completo, idade, sexo, tempo de diagnóstico da doença, exames já realizados, drogas em uso e possível histórico de Tb.
- Benefícios: Sua participação neste trabalho contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos da doença. Esta melhor compreensão poderá influir no tratamento e também na sua prevenção através do futuro desenvolvimento de uma melhor vacina para a tuberculose.

- Possíveis Riscos: A coleta de sangue através de punção venosa não acarreta riscos a saúde. Todo material usado será estéril e descartável.

- Permissão para revisão dos dados e confidencialidade: Todos os seus registros e dados obtidos no estudo serão confidenciais. Porém, o Sr. (a) fica ciente, pelo presente documento, que o acesso a essas informações poderá ser permitido a um número limitado de integrantes da equipe participante do projeto. Caso o Sr. (a) julgue necessário, poderá ler o referido projeto, que estará disponível a sua solicitação.

### CONSENTIMENTO

- Entendimento por parte do participante: O pesquisador responsável colocou-me a par das informações necessárias, relacionadas aos exames e ao objetivo da pesquisa. Autorizo, por este documento, a minha participação neste projeto. Fui informado que posso me retirar desta pesquisa a qualquer momento e que a suspensão de meu consentimento não impedirá que eu continue a receber a assistência médica necessária.

Com base no exposto anteriormente, dou meu consentimento para participar voluntariamente desta pesquisa.

---

**Assinatura do Paciente**

---

**Pesquisador Colaborador**

Prof. Geraldo M. B. Pereira  
Laboratório de Imunopatologia/ UERJ  
Laboratório de Hanseníase/ FIOCRUZ

---

**Pesquisador Colaborador**

Dr. Geraldo da R. Castelar Pinheiro  
Disciplina de Reumatologia/ HUPE - UERJ

---

**Pesquisador Colaborador**

Marcela da S. Sousa  
Laboratório de Imunopatologia/ UERJ

---

**Coordenador do Projeto**

Dra. Euzenir Nunes Sarno  
Laboratório de Hanseníase  
Depto. Micobacterioses IOC/ FIOCRUZ

---

**Pesquisador Responsável**

Dra. Elizabeth Pereira Sampaio  
Laboratório de Hanseníase  
Depto. Micobacterioses IOC/ FIOCRUZ

## LISTA DE SOLUÇÕES E REAGENTES

### OBTENÇÃO DE CMS:

- 1) Heparina sódica (Roche);
- 2) Ficoll-paque: gradiente de separação (Amersham Biosciences);
- 3) Salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4: Cloreto de sódio 8g (Limpatex), cloreto de potássio 0,2g (Baker Chemical), fostato de sódio dibásico 2,89g (Sigma), fostato de potássio monobásico 0,2g (Sigma), água deionizada 1000mL;
- 4) Soro fetal bovino (SFB): inativado por 1h a 56° C (Biomast);
- 5) Meio de cultura completo (MCC): RPMI 1640 (Gibco-BRL), L-glutamina 2mM (Gibco-BRL), Hepes 25mM (Gibco-BRL), Penicilina U/mL (Gibco-BRL), Estreptomicina 100 µg/mL (Gibco-BRL), Bicarbonato de sódio 2mg/mL (Sigma) e 10% de SFB.

### ESTÍMULOS:

Estímulo	Descrição	Marca	Concentração
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i> - superantígeno	Sigma	1µg/mL
PPD	Purified Protein Derivated	Mycos LLC	10µg/mL
PA	Pool de 9 peptídeos sintéticos de ESAT-6	Universidade de Leiden	9µg/mL

### CITOMETRIA DE FLUXO:

#### Soluções:

- 1) Paraformaldeído 1% (Riedel-De Haën);
- 2) Brefeldina A: diluída 10x o estoque em MCC (Sigma);
- 3) Solução de Permeabilização (SP): diluído 10x em água deionizada (BD);
- 4) Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA): diluído a [0,02%] em PBS (Sigma);
- 5) Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma);



6) Tampão de citometria 1: PBS/ 0,1% BSA (Sigma)/ 0,1% azida sódica (Grupo Química);

7) Tampão de citometria 2: PBS/ 0,1% azida sódica (Grupo Química).

#### Anticorpos:

<b>Anticorpo</b>	<b>Relevância</b>	<b>Fluorcromo</b>	<b>Emissão Max. (nm)</b>
$\gamma 2a/ \gamma 1/CD4$	Isotipo (Is/CD4)	FITC/PE/PerCP.Cy	525/ 575/ 675
$\gamma 2a/ \gamma 1/CD8/CD3$	Isotipo (Is/CD8)	FITC/PE/PerCp.Cy/APC	525/ 575/ 675/ 660
IFN $\gamma$ /CD69/CD4	Específico	FITC/PE/PerCP.Cy	525/ 575/ 675
IFN $\gamma$ /CD69/CD8/CD3	Específico	FITC/PE/PerCp.Cy/APC	525/ 575/ 675/ 660

*FITC – Isotrocianato de fluoresceína; PE- Ficoeritrina; PerCp - Complexo Proteína-Clorofila-Peridina; Cy - CyCromo ; APC - Aloficocianina. Kits Fastimmune™, BD Biosciences, EUA.*

#### Co-estímulos (ce):

1. Anti-CD28 [1 $\mu$ g/mL] (BD-Pharmingen);
2. Anti-CD49d [1 $\mu$ g/mL] (BD-Pharmingen).

#### **IMUNOENSAIO (ELISA):**

##### Soluções:

1) Tampão carbonato-bicarbonato: 4mL de carbonato de sódio anidro a 0,2M (Sigma)/ 46mL de bicarbonato de sódio a 0,2M (Sigma), ambos diluídos em água deionizada;

2) Tampão de bloqueio: PBS/ 1% BSA;

3) Tampão de lavagem: PBS/ 0,05% Tween 20 (Gibco-BRL);

4) Solução de Diluição: PBS/ 1% BSA/ 0,05% de Tween 20;

5) Substrato TMB: 5mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 5mL Tetrametilbenzidina (BD-Pharmingen);

6) Ácido sulfúrico: usado a 2,5N (Vetec).

Anticorpos para ELISA:

1. Anti-IFN $\gamma$  humano de captura [4 $\mu$ g/mL] (BD-Pharmingen);
2. Anti-IFN $\gamma$  humano biotilado [100ng/mL] (BD-Pharmingen);
3. IFN $\gamma$  padrão: 30ng de IFN $\gamma$  recombinante humano em 500 $\mu$ L de solução de diluição (BD-Pharmingen);
4. Estreptoavidina-HRP (SAv-HRP) [diluída 1000x do estoque] (BD-Pharmingen).

**Brazilian Rheumatoid Arthritis Patients negative to Tuberculin Skin Test respond *in vitro* to PPD and to ESAT-6-derived Peptides**

*Running title: Tuberculin Skin Test and Rheumatoid Arthritis*

Authors: Marcela da S.Sousa<sup>2</sup>, Geraldo da R. Castelar Pinheiro<sup>2</sup>, Iris M. P. Alvim<sup>2</sup>, Annemiek Geluk<sup>3</sup>, Tom H. M. Ottenhoff<sup>3</sup>, Kess L. M. C. Franken<sup>3</sup>, Elizabeth P. Sampaio<sup>1</sup>, and Geraldo M. B. Pereira<sup>1,2\*</sup>

Leprosy and Cellular Microbiology Laboratories, Department of Mycobacterioses, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation<sup>1</sup>, and Laboratory of Immunopathology and Rheumatology Unit, School of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>2</sup>; Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden<sup>3</sup>, and Department of Biomedical Research, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands<sup>4</sup>.

\*Corresponding author. Mailing address: Department of Mycobacterioses, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil 3465, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900. Phone: 55 21 25980-4287. Fax: 55 21 2270-9997. e-mail: [gerald@fiocruz.br](mailto:gerald@fiocruz.br)

**Abstract**

*In vitro* IFN- $\gamma$  production and frequencies of IFN- $\gamma$ -positive T cells were found in response to PPD and ESAT-6, in six TST-negative Brazilian rheumatoid arthritis patients (RA), comparable to two TST-positive patients. Thus, failure to react to mycobacterial antigens in RA does not exclude exposure to mycobacteria or presence of specific memory T cells.

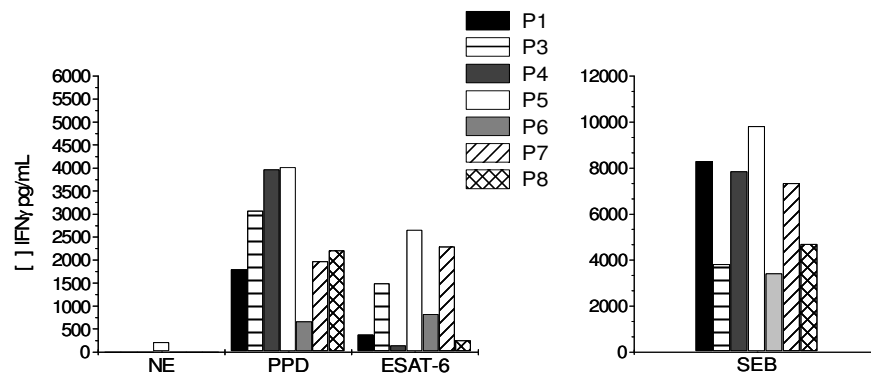
---

Presently, the treatment of rheumatoid arthritis (RA) is increasingly relying upon the use of biological response modifiers (BRM), but specially in the case of TNF- $\alpha$  ligands, there is an important increase in the risk of inducing the evolution of latent tuberculosis (Tb) infection to active pulmonary disease. In the Americas approximately 50% of Tb cases occur in Brazil and Peru. Recently, Peruvian investigators found that tuberculin skin test (PPD) was negative, or had a reduced intensity, much more frequently in RA patients than in the non-RA counterparts (7). This problem in the diagnosis of latent Tb increases, specially in endemic countries such as Brazil, where other mycobacterial diseases are endemic, and BCG vaccination is used (2). In order to investigate the mechanisms underlying unresponsiveness to PPD in RA patients, this work evaluated *in vitro* immune response parameters to PPD and synthetic peptides derived from ESAT-6, a protein expressed by *Mycobacterium tuberculosis* and pathogenic *Mycobacterium bovis*, but not by the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine (1), in RA patients being considered for BRM treatment, under follow-up at the State University of Rio de Janeiro Hospital (Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ). The investigation protocols were approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation.

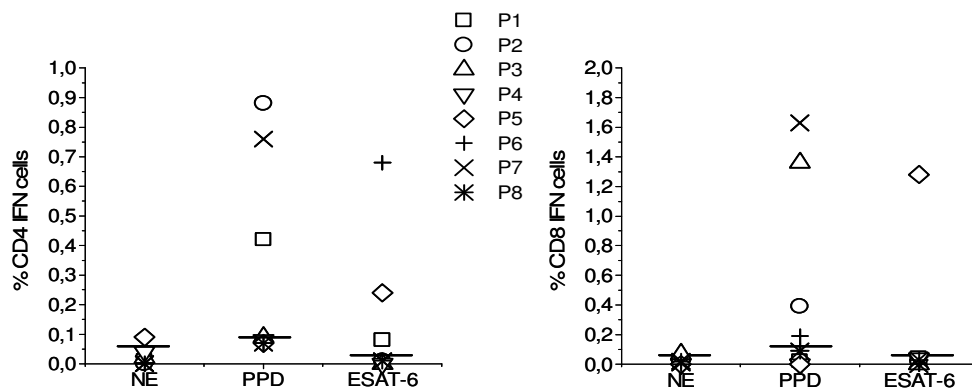
Mononuclear leukocytes isolated by ficoll-hypaque gradient centrifugation from blood of 08 RA patients (6 female, 2 male) were cultured at 37<sup>0</sup>C, in a humidified CO<sub>2</sub> incubator, for 6 hours (for enumeration of antigen-responsive T cells; in the presence of anti-CD28 and anti-CD49d monoclonal antibodies as specified in the Intracellular detection kit, BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) or 5 days (determination of IFN- $\gamma$  levels), in the presence of the

appropriate stimuli (SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, 1mg/ml, Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA, 1µg/ml; PPD, 10µg/ml, Mycos Research LLC, Loveland, CO, USA; ESAT-6 peptides, mix of ESAT-6-derived overlapping synthetic peptides, 9µg/ml, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands) (1), in supplemented RPMI 1640 (10% fetal bovine serum; penicillin, 100U/mL; streptomycin,100U/mL; and 2 mM L-glutamine, Gibco BRL, USA).IFN $\gamma$  levels in culture supernatants were determined by ELISA according to manufacturer instructions (BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA), and the frequencies of IFN $\gamma$ -producing CD69+T lymphocytes, present in the blood were analyzed by flow cytometry in PPD-positive (n=2) and PPD-negative (n=6) RA cases (Table I).

Our RA patients had no clinical evidence or complaints related to active pulmonary tuberculosis. The majority of The PPD-negative RA patients here investigated responded *in vitro* to PPD, and IFN- $\gamma$  levels in PPD-stimulated cultures of PPD-positive and negative individuals were comparable. *In vitro* responsiveness to the ESAT-6-derived synthetic peptides did not parallel the responses *in vivo* or *in vitro* to PPD (FIG. 1). This observation suggests that exposure to other mycobacteria besides *M. tuberculosis* can also be related to the skin tests positive for PPD in our RA patients (FIG. 1).



The observed frequencies of IFN $\gamma$ -producing T lymphocytes specific for ESAT-6 and PPD demonstrate that the pools of memory T cells responsive to mycobacterial antigens can be of equivalent dimensions in RA patients with positive and negative tuberculin skin tests (FIG. 2). The frequencies, specially of IFN+, PPD-responsive CD4+ T cells are among the highest in the two TST positive individuals (P1 and P2) but, P7 a TST negative individual displays numbers comparable to P2, the patient with the more intense TST readout in the whole group.



Another group of patients with lower than expected responses to TST are the end-stage chronic renal (CR) patients. A defect in the second signal for T cell activation has been described in this group of patients. TST evaluation in CR patients in parallel with enumeration of IFN- $\gamma$  producing, PPD- and ESAT-6-specific T cells, allowed the demonstration that 85.7% of the control individuals with PPD-specific T cells were TST positive, but only 50% of the CR patients with In vitro response to PPD had matching TSTs ((P=0.007). As half of the controls and CR patients also responded in vitro to ESAT-6, these observations point to enumeration of T cells, specially the cells responsive to *M. tuberculosis* antigens,

absent from BCG, as a solution for diagnosis of latent tuberculosis in this group of individuals (8). More recently, investigation done in Gambia, determining exposure to *Mycobacterium tuberculosis*, by evaluating a gradient of sleeping proximity to an index tuberculosis case. The exposure to *Mycobacterium tuberculosis* was compared to frequencies of T cells specific for ESAT-6 and CFP-10, two proteins specific of pathogenic mycobacteria, and levels of exposure correlated to frequencies of *M. tuberculosis*-specific T cells determined using ELISPOT(3).

An important aspect to be taken into consideration when discussing the TST unresponsiveness present in RA patients responsive in vitro to PPD and ESAT-6 is the possible action of the drugs in use by our patients inhibiting the inflammatory response in the TST. IL-8 importance in the inflammatory response associated to TST was previously demonstrated (5) . Recent work produced evidence that a drug in use by RA patients, methotrexate, inhibits receptors important for leukocyte adhesion. Those receptors are critical for the activation of immune and inflammatory response steps, such as IL-15 production by the inflamed connective tissue, and, as a consequence, the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-17 by T lymphocytes is negatively modulated (6). This is a drug in use by our group of patients and frequently prescribed for RA. The hypothesis of inhibition of the TST response by methotrexate is further supported by the finding that this drug, at the levels used for treating RA inhibits the expression of cutaneous lymphocyte antigen, a receptor involved in homing of memory-effector T lymphocytes to the skin (4).

Thus, the negativity of the test is more likely associated to reduced capacity of the PPD-specific T cells for homing to the skin and/or for inducing cutaneous inflammation in response to PPD.

Taken together our observations question the relevance of the tuberculin skin test for identifying latent Tb in RA, specially in patients from endemic regions for Tb, and point to the need for a prospective investigation of RA patients responding *in vitro* to PPD/and or *M. tuberculosis*-specific antigens, for evaluating levels of IFN $\gamma$  and IL17, as well as *M. tuberculosis*-specific T cell subsets in correlation with prognosis of evolution for active tuberculosis.

#### References

1. **Arend, S. M., A. Geluk, K. E. van Meijgaarden, J. T. van Dissel, M. Theisen, P. Andersen, and T. H. Ottenhoff.** 2000. 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* **68**:3314-3321.
2. **Cardoso, F. L., P. R. Antas, A. S. Milagres, A. Geluk, K. L. Franken, E. B. Oliveira, H. C. Teixeira, S. A. Nogueira, E. N. Sarno, P. Klatser, T. H. Ottenhoff, and E. P. Sampaio.** 2002. T-cell responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect Immun* **70**:6707-6714.
3. **Hill, P. C., D. Jackson-Sillah, A. Fox, K. L. Franken, M. D. Lugos, D. J. Jeffries, S. A. Donkor, A. S. Hammond, R. A. Adegbola, T. H. Ottenhoff, M. R. Klein, and R. H. Brookes.** 2005. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. *J Clin Microbiol* **43**:2070-2074.



4. **Johnston, A., J. E. Gudjonsson, H. Sigmundsdottir, B. R. Ludviksson, and H. Valdimarsson.** 2005. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* **114**:154-163.
5. **Larsen, C. G., M. K. Thomsen, B. Gesser, P. D. Thomsen, B. W. Deleuran, J. Nowak, V. Skodt, H. K. Thomsen, M. Deleuran, and K. Thestrup-Pedersen.** 1995. The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. *J Immunol* **155**:2151-2157.
6. **Miranda-Carus, M. E., A. Balsa, M. Benito-Miguel, C. Perez de Ayala, and E. Martin-Mola.** 2004. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *J Immunol* **173**:1463-1476.
7. **Ponce de Leon, D., E. Acevedo-Vasquez, A. Sanchez-Torres, M. Cucho, J. Alfaro, R. Perich, C. Pastor, J. Harrison, and C. Sanchez-Schwartz.** 2005. Attenuated response to purified protein derivative in patients with rheumatoid arthritis: study in a population with a high prevalence of tuberculosis. *Ann Rheum Dis* **64**:1360-1361.
8. **Sester, M., U. Sester, P. Clauer, G. Heine, U. Mack, T. Moll, G. W. Sybrecht, A. Lalvani, and H. Kohler.** 2004. Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* **65**:1826-1834.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)