Luciena Cegatto Martins Ortigosa

Avaliação da resposta imune anti-*Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com psoríase moderada a grave submetidos à terapia com inibidor de fator de necrose tumoral, infliximabe

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ortigosa, Luciena Cegatto Martins

Avaliação da resposta imune anti-*Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com psoríase moderada a grave submetidos à terapia com inibidor de fator de necrose tumoral, infliximabe / Luciena Cegatto Martins Ortigosa. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Psoríase/terapia 2.Tuberculose 3.ELISPOT 4.Anticorpos monoclonais 5.Fator de necrose tumoral alfa 6.Infliximabe

USP/FM/DBD-399/13

DEDICO ESTE TRABALHO

AOS MEUS TRÊS TESOUROS ENVIADOS POR DEUS:

MEU MARIDO JOÃO E MINHAS FILHAS YARA E LAURA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu Deus, por Ele ter me conhecido desde o ventre da minha mãe e, aos meus genitores Lourival e Neusa, aos quais Ele me entregou para me educarem. Eu os respeito e amo; sempre os amarei.

Aos meus irmãos Anestella e Fábio, presentes em toda a minha infância e até hoje.

Ao meu cônjuge João, que conseguiu estar ao meu lado até o final de mais esta trajetória, e às minhas filhas Yara e Laura que muito foram privadas da minha presença durante as suas criações, porém, têm se mostrado filhas companheiras e pessoas íntegras, em quem eu posso confiar.

Aos meus professores desde a faculdade até o doutorado: Edson Bonini, Silmar Régis Camarini, Vitor Manuel Silva dos Reis, Mário César Pires, Maria do Rosário Vidigal, dentre outros, que me ensinaram não apenas dermatologia, mas principalmente a importância de sermos íntegros e humanos acima de tudo.

Aos meus colegas de profissão: Ângela Marques Barbosa, Deusita Gandia Soares, Flávia Brasileiro de Medeiros, Karina Sunaga, Priscila GomesVieira, Silveli Akemi Shibata, e tantos outros que me estimulam sempre ao conhecimento e acreditam na minha dedicação.

Aos meus ex-alunos e pacientes, para quem também ofereço este trabalho.

Ao meu orientador e amigo Gil Benard, a Léia Cristina Rodrigues da Silva e todos os outros cooperadores do Laboratório de Imunologia - LIM 53, obrigada pelo auxílio constante, sem vocês não conseguiria o estímulo necessário para a finalização deste.

A Marlene Spir e Henrique Liberato Salvador que cooperaram com o envio do material para São Paulo e, também, a Edmundo Pereira de Souza Neto e Fábio Henrique Luiz Leonardo que me auxiliaram com a realização da aula e bibliografia.

Às minhas auxiliares pessoais Tatiane da Costa Polido Bordão, Aline dos Santos Polido e Eliana Cristina Pedro Gonzaga, não tenho aqui como expressar o carinho e quão importante vocês se tornaram na minha vida.

A todos estes o meu muito obrigado.

**“Vencedores não são aqueles que nunca falham,
mas os que nunca desistem.”**

Edwin Louis Cole

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Psoríase	4
1.2	História.....	4
1.3	Epidemiologia	5
1.4	Etiologia	5
1.5	Patogênese.....	8
1.6	Família TNF- α	13
1.7	Quadro clínico e diagnóstico	16
1.8	Tratamento	20
1.9	Infliximabe.....	20
1.10	Tuberculose.....	24
1.11	Métodos para a avaliação de infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mtb</i>)	29
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVO	34
4	CASUÍSTICA	36
4.1	Pacientes	38
5	MÉTODOS.....	40
5.1	Antígenos	41
5.2	Separação e armazenamento das células mononucleares	41
5.3	Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ (ELISPOT) com CFP-10 e ESAT-6	42
5.4	Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ por ELISPOT com PPD	43
5.5	Determinação da Produção de IFN- γ em Sobrenadantes de Cultura de PBMC por ELISA.....	44

6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
7	RESULTADOS	48
7.1	Seleção da casuística e obtenção e armazenamento de células mononucleares dos pacientes durante o tratamento com inibidor de TNF	49
7.2	Correlação do resultado de ELISPOT para IFN- γ com a evolução clínica ao longo do tratamento nos 12 pacientes	53
7.3	Análise da resposta de INF- α ao longo do tratamento por ELISPOT e ELISA do grupo de pacientes estudado:	66
8	DISCUSSÃO.....	70
9	CONCLUSÃO.....	78
10	REFERÊNCIAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artrite Reumatoide
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
BCIP/NBT	“5-Bromo-4-chloro-3-indoxil-phosphate”
BSA1	“Body Surface Area”
BSA 2	“Bovine Serum Albumine”
CMV	Citomegalovírus
CLA	Antígeno Cutâneo Linfático
CFP-10	“Culture Filtrate Protein” 10
DIIM	Doenças Inflamatórias Imunomediadas
DC	Doença de Crohn
EA	Espondilite Anquilosante
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	“Enzyme Linked ImmunoSPOT Assay”
ESAT-10	“Early Secreted Antigenic Target-6”
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade
ICAM I	Molécula de Adesão Intercelular
IGRA	Ensaio de Liberação de Interferon
IL	Interleucina
INF	Interferon
i-TNF- α	Inibidores do Fator de Necrose Tumoral Alfa
MHC	Complexo de Histocompatibilidade

<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTX	Metotrexato
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PASI	“ <i>Index</i> ” de Área e Gravidade da Psoríase
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PHA	Fitoaglutinina
PPD	Derivado Proteico Purificado
PSORS	“Psoriasis Susceptibility”
RNI	Intermediários Reativos do Nitrogênio
ROR	Receptor Nuclear Hormonal
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
SEB	Proteína de Choque Térmico Enterotoxina B do Estafilococo
SFB	Soro Fetal Bovino
TACE	Enzima de Conversão do Fator de Necrose Tumoral
Tb	Tuberculose
TGF	Fator de Transformação de Crescimento
Th	Linfócitos T “Helper”
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFs	Fator de Necrose Tumoral Solúvel
TNFtm	Fator de Necrose Tumoral Transmembrânico
TRAF	Fatores Associados ao Receptor de TNF
TT	Teste Tuberculínico
UVA	Ultra Violeta A
UVB	Ultra Violeta B

LISTA FIGURAS

Figura 1.	Fisiopatologia da Psoríase.....	12
Figura 2.	Desenho do estudo	39
Figura 3.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #1	53
Figura 4.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #2	54
Figura 5.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #3	55
Figura 6.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #4	56
Figura 7.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #5	57
Figura 8.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #6	58
Figura 9.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #7	59
Figura 10.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #8	61
Figura 11.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #9	62
Figura 12.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #10	63
Figura 13.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #11	64
Figura 14.	Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #12	65
Figura 15.	Resultado dos ensaios ELISPOT ao longo do tratamento realizado sem estímulo, e, usando como antígenos a PHA, o SEB e o CMV	67
Figura 16.	Resultados positivos do ELISPOT realizado com antígenos específicos para Tb (CFP-10, ESAT-6 e PPD)	67
Figura 17.	Resultados com o método ELISA ao longo do tratamento realizado com os antígenos PHA, SEB, CMV e no último gráfico mostrando apenas os casos com positividade ao antígeno PPD.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Loci</i> genéticos associados à psoríase	7
Tabela 2.	Medida do PASI	19
Tabela 3.	Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo	49
Tabela 4.	PASI medido em cada coleta.....	50
Tabela 5.	Porcentagens de viabilidade das PBMC imediatamente e 3-4 h após o descongelamento, respectivamente	51

RESUMO

Ortigosa LCM. *Avaliação da resposta imune anti-Mycobacterium tuberculosis em pacientes com psoríase moderada a grave, submetidos à terapia com inibidor de fator de necrose tumoral, infliximabe* [tese] – São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 103p.

O tratamento de pacientes apresentando doenças inflamatórias imunomediadas com drogas anti-TNF- α aumenta o risco da reativação da tuberculose. Isso sugere que tais drogas possam afetar a imunidade celular destes. No entanto, há dados conflitantes sobre se esse tratamento suprime as respostas para o teste tuberculínico (TT) e os ensaios de liberação de interferon-gama (IGRAs) e poucos dados em pacientes com psoríase. O presente estudo avaliou pacientes com psoríase moderada a grave enfocando os efeitos do tratamento com infliximabe em suas respostas imunológicas celulares. Foram avaliadas as respostas imunes celulares de doze pacientes antes e durante o tratamento com infliximabe. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas com a fito-hemaglutinina (PHA), o superantígeno enterotoxina B (SEB), um lisado de citomegalovírus (CMV), e antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, e a ativação de linfócitos foi avaliada por ELISPOT para enumerar células secretoras de IFN- γ , por ELISA para detecção da secreção de IFN- γ , e através da incorporação de [3 H] timidina para medir a proliferação. O tratamento com infliximabe não levou à redução de IFN- γ e da resposta linfoproliferativa nos pacientes. Pelo contrário, aumentou a liberação desta citocina em culturas de PBMC estimulados com PHA e SEB por 12 h. Este efeito foi mais notado no pico do efeito clínico do agente anti-TNF (7 semanas de tratamento) e menos proeminente no seu nadir (logo antes da infusão da próxima dose). Reatividade imunitária ao CMV também não foi significativamente afetada, notando-se leve aumento pelo agente anti-TNF. É de se notar que secreção de IFN- γ e resposta proliferativa a *Mtb* dos dois pacientes TT positivos foram, também, visivelmente aumentadas na semana 7, declinando quando infliximabe atingiu o seu nadir. Os efeitos deletérios do bloqueio do TNF em pacientes com psoríase grave, submetidos ao tratamento com infliximabe parecem ser atenuados, pelo menos parcialmente, por um efeito de aumento na imunidade mediada por células desses pacientes, possivelmente pela diminuição da ação imunossupressora decorrente do excesso de TNF.

Descritores: 1.Psoríase/terapia 2.Tuberculose 3.ELISPOT 4.Anticorpos monoclonais 5.Fator de necrose tumoral alfa 6.Infliximabe

SUMMARY

Ortigosa LCM. *Evaluated of immune responses anti-Mycobacterium tuberculosis in patients with psoriasis moderate to severe undergoing treatment with TNF blocking agent, infliximab* [thesis] – São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013. 103p.

Treatment of patients with immune-mediated inflammatory diseases with anti-TNF agents increases the risk of tuberculosis reactivation, suggesting that it may affect their cellular immune response. However, there are conflicting data on whether anti-TNF treatment suppresses the responses to tuberculin skin test (TST) and interferon- γ release assays and no information regarding psoriasis patients on anti-TNF treatment. The present study evaluated patients with moderate to severe psoriasis focusing on the effects of treatment with infliximab on their cellular immune responses. Cellular immune responses of twelve patients were evaluated before and during infliximab treatment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with phytohemagglutinin (PHA), the superantigen enterotoxin B (SEB), a cytomegalovirus lysate (CMV), and *Mycobacterium tuberculosis* antigens, and the lymphocyte activation was evaluated by ELISPOT for enumeration of IFN- γ -secreting cells, ELISA for detection of secreted IFN- γ , and by [3 H]thymidine incorporation for proliferation measurement. Treatment with infliximab does not lead to reduction in the INF- γ and lymphoproliferative responses of patients. It rather increased the overnight release of this cytokine in PBMC cultures stimulated with PHA and SEB. This effect was most noted at the peak of the clinical effect of the anti-TNF agent (week 7 of treatment) and less prominent at its nadir (just before infusion of the next dose). Immune reactivity to CMV was also either unaffected or slightly increased by the TNF blocking agent. Of note, the IFN- γ and proliferative responses to *Mtb* from the two TST-responder patients were also remarkably increased at week 7, declining when infliximab reached its nadir. The deleterious consequences of TNF blockade in patients with severe psoriasis undergoing infliximab treatment may be in part attenuated by an enhancing effect on the cell mediated immunity of the patients, possibly due to the abbreviation of the immunosuppressive effect of TNF overexpression.

Descriptors: 1.Psoriasis/therapy 2.Tuberculosis 3.ELISPOT 4.Monoclonal antibodies 5.Tumor necrosis factor alpha 6. Infliximab

1 INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, com importante predisposição genética, que afeta entre 2 a 3% da população mundial (Gelfand et al., 2005). Segundo o Consenso Brasileiro de Psoríase (2012) não existem estudos sobre a sua prevalência no Brasil. A psoríase e a artrite psoriásica são caracterizadas por ciclos de remissão e exacerbação, com importante impacto sobre a qualidade de vida do paciente (Gisondi; Girolomi, 2009), comparado ao que ocorre com o câncer, a hipertensão arterial e o *diabetes mellitus* (Rapp et al., 1999). Isso causa preocupação acerca dos prejuízos sistêmicos da psoríase, que seguindo a tendência dos estudos mais recentes, não deve ser vista como uma doença confinada à pele, e sim, uma condição inflamatória sistêmica (Rocha-Pereira et al., 2004; Kaplan, 2008).

O Infliximabe é uma droga antifator de necrose tumoral (TNF- α) usada para o tratamento da psoríase moderada a grave que pode, como outros inibidores de TNF- α (i-TNF- α), aumentar o risco de reativação da tuberculose (Tb) devido à ação do TNF na formação e manutenção do granuloma, o que impede a progressão da doença nas formas quiescentes. Então, é de suma importância, a pesquisa de Tb latente nos pacientes candidatos ao uso das drogas i-TNF- α (Lopes et al., 2011).

A Sociedade Americana do Tórax define como Tb latente indivíduos com teste tuberculínico (TT) positivo, análise bacteriológica negativa e ausência de evidências clínicas ou radiológicas de Tb ativa (ATS/CDCP, 2000), muitos estudos já foram realizados, porém, a maioria deles em países onde a Tb não é endêmica. No Brasil, os exames solicitados para detecção da Tb latente são o TT e a radiografia de tórax, todavia, devido à vacinação com a BCG ser rotina no país, o TT pode apresentar

resultados falsos positivos e, ainda, na psoríase, o fenômeno isomórfico de Koebner pode causar no local da aplicação do TT um processo inflamatório local, levando a resultados falsos positivos (ATS, 2000; ATS/CDCP, 2000; Lopes et al., 2011). Por outro lado, a realização deste exame nos pacientes psoriásicos em uso de imunossupressores como o metotrexato (MTX), pode resultar em um TT falso negativo (Salgado; Gomez-Reino, 2011).

Devido a todos esses questionamentos, tem-se utilizado outros exames para a pesquisa de Tb latente, dentre eles o “Enzyme Linked ImmunoSPOT Assay” (ELISPOT) mostrou-se eficaz na detecção da doença, aumentando a acurácia diagnóstica e ajudando a diminuir a chance de reativação da Tb quando estes pacientes fazem a profilaxia antes de iniciar o tratamento com a droga i-TNF- α (Arend et al., 2001; Salgado; Gomez-Reino, 2011). Estes testes são realizados como rotina em alguns países e são mais vantajosos operacionalmente, apresentando acurácia diagnóstica maior que o TT. Nestes exames as células do sangue periférico são estimuladas com antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e as células T memória-efetoras do sangue periférico, ao reconhecerem o antígeno, se ativam e após algumas horas, liberam citocinas, comprovando, assim, a resposta imunocelular específica contra o *Mtb*. Como as citocinas liberadas em maior quantidade são os INF- γ estes ensaios foram denominados ensaios de liberação de INF (IGRA). Eles foram desenvolvidos no intuito de auxiliar o diagnóstico da Tb latente e são aplicáveis principalmente em pacientes imunocomprometidos, tais com: HIV positivos, indivíduos em quimioterapia para neoplasias, em terapêutica com drogas i-TNF- α , dialíticos e transplantados. Colaboram no rastreamento em grupos de alto risco como nos casos de suspeita de Tb e no estudo de contactantes, além de corroborarem o

diagnóstico da infecção ou a exclusão da Tb. São usados principalmente em saúde ocupacional, pois requerem apenas uma única amostra obtida em uma só visita do paciente (Pai et al., 2006).

1.1 Psoríase

É uma doença inflamatória crônica imunomediada, de base genética, recorrente, que afeta a pele e articulações (Christophers; Mrowietz, 1999; Lebwohl, 2003; Gottlieb et al., 2004). É considerada doença poligênica e pode ser desencadeada por vários fatores como traumas, infecções ou medicamentos que desencadearão fenótipos diferentes da doença, dependendo da predisposição do indivíduo acometido (van de Kerkhof; Schalkwijk, 2008). Caracteriza-se por placas eritematoescamosas, bem delimitadas, ocasionalmente pruriginosas, em áreas de trauma da pele, principalmente nos cotovelos, joelhos e no couro cabeludo (Lebwohl, 2003).

1.2 História

Foram encontrados papiros egípcios (papiro de Ebers) descrevendo a doença e seu tratamento, datados de 1550 a.C. (Rodrigues;Teixeira, 2009), Celsus (25 a.C. – 45 d.C.) mostrou o primeiro quadro de psoríase, Hipócrates a relatou juntamente com a hanseníase e a palavra “psora”, foi usada pela primeira vez por Galeno para descrever doenças eczematosas (Romiti, 2013). Até o século IX os pacientes com psoríase eram

rejeitados, diagnosticados como leprosos e separados das comunidades, até que Robert Willian em 1809 descreveu a doença separadamente, porém, apenas Hebra (1841) apud van de Kerkhof; Schalkwijk (2008), conseguiu individualizar a psoríase separando-a definitivamente da hanseníase.

Em 1879, Heinrich Koebner descreveu o fenômeno isomórfico como forma de desencadear as placas de psoríase em áreas sãs através de injúria local, usando este método como diagnóstico para diferenciar a psoríase da lues secundária (van de Kerkhof; Schalkwijk, 2008).

1.3 Epidemiologia

Acomete igualmente ambos os sexos, é uma doença relativamente frequente, universal e ocorre entre 2 a 3% da população geral, porém, sua prevalência é variável dependendo do grupo étnico estudado. A psoríase pode se iniciar em qualquer idade, sendo demonstrados dois tipos: o tipo I com pico de incidência entre 18 a 22 anos, que são casos mais graves e relacionados à hereditariedade; e o tipo II (25% dos casos) com início mais tardio, apresenta o pico de incidência entre 55 a 60 anos (Green, 1984). No entanto, a doença pode se manifestar em qualquer idade, sendo mais frequente na terceira e quarta décadas. Em crianças a idade média é de oito anos e o quadro mais comum é a psoríase em gotas (Christophers; Mrowietz, 1999). A psoríase é mais frequente em climas frios do que nos trópicos (Raychaudhuri; Farber, 2001).

1.4 Etiologia

Sabe-se que existe em primeiro lugar uma predisposição genética levando a alterações bioquímicas, imunológicas e vasculares culminando em uma epiderme com crescimento e diferenciação alterados.

Quando existe tendência familiar há forte associação com antígenos leucocitários HLA-Cw6 e DR7 (Farber; Nall, 1998), A1, B13, B17 e outros (Raychaudhuri; Farber, 2001). A análise de concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos é um método usado para examinar a influência dos fatores genéticos em uma doença. Farber e Nail (1974) demonstraram entre 141 pares de gêmeos monozigóticos que 82 eram concordantes para psoríase enquanto 59 eram discordantes. Dos 155 pares de gêmeos dizigóticos apenas 31 eram concordantes e 124 discordantes para psoríase. Os mesmos autores relatam estudo realizado na Alemanha demonstrando que, quando ambos os pais apresentavam psoríase, o risco dos filhos desenvolverem a doença era de 41%, quando apenas um genitor apresentava a doença este risco diminuiu para 14%, um parente de primeiro grau acometido o risco passou para 6% e nenhum parente o risco chegou a 2%.

Os antígenos de histocompatibilidades (HLA) são antígenos de superfície das células humanas e a sua correspondência a uma região cromossômica é chamada de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) que estão situados no braço curto do cromossomo 06. A psoríase está associada a vários HLAs, tais como: HLA-B13, HLA- B17, HLA- B37, HLA- Bw16, HLA-B46, HLA-B57, HLA-Cw1, HLA-Cw6, HLA-DR7e HLA-DQ9; porém, muitos destes alelos estão em desequilíbrio genômico com o HLA-Cw6, pois se encontram juntos nos mesmos cromossomos (Elder et al., 1994; Rahman; Elder, 2005). O haplotipo (EH) Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-

DQB1*0303 confere um risco relativo alto para o desenvolvimento da psoríase na população caucasiana, ele também está associado ao aparecimento da doença em pacientes jovens, sendo que alguns autores consideram a psoríase tipo I como aquela que aparece nestes pacientes com antecedentes familiares da doença e expressando HLA-Cw6, e a psoríase tipo II quando o quadro inicia-se mais tardiamente, sem história familiar e sem a expressão do HLA-Cw6 (Schmitt-Egenolf et al., 1996).

Estudos genômicos identificaram a associação de *loci* cromossômicos com os genes que conferem risco para a doença, chamados “*psoriasis susceptibility*” (PSORS). Até hoje foram descritos 10 PSORS, conforme demonstrado no tabela 1, porém, ainda não foram definidos os “*loci*” de vários outros genes identificados, assim sendo, em breve estes PSORS tendem a aumentar (Duffin et al., 2008).

Tabela 1. *Loci* genéticos associados à psoríase

Loci	Região	Genes que conferem risco para Psoríase
PSORS 1	6p21.3	HLA-CW6 – CDSN, HCR, HERV-K, HCG2, 7PSORS1C3,POU5F1, TCF19, CCHCR1, LPM, SEEK1, SPR1
PSORS 2	17q25	RUNX1 – RAPTOR – SLC9A3R1 – NAT9 - TBCD
PSORS 3	4q34	IRF – 2
PSORS 4	1q21	S100 e genes do complexo de diferenciação epidérmica
PSORS 5	3q	SCL12A8
PSORS 6	19p31	JunB
PSORS 7	1p	II-23r (1p32.1-31.2)
PSORS 8	16q	CX3CL1, CX3R1
PSORS 9	4q31	IL-15
PSORS 10	18p11	
NAO IDENTIFICADO	5q31-1-33-1	IL12B-IL13-IL3, IL4, IL5, CSF2, IRF1
NAO IDENTIFICADO	9q33-34	
NAO IDENTIFICADO	6p22	CDKALI
NAO IDENTIFICADO	19q34	KIR2DSI, KIR2DLI, KIR2DL5

Adaptado de Lima, 2010

Nos pacientes geneticamente predispostos, fatores desencadeantes externos e sistêmicos podem estar associados com o início e/ou exacerbação da doença. As lesões

podem aparecer após exposição solar intensa, erupções morbiliformes causadas por drogas ou vírus e o tempo entre o trauma e o início das lesões de psoríase é, em média, de duas a seis semanas (van de Kerkhof; Schalkwijk, 2008). Causas sistêmicas incluem infecções, particularmente bacterianas, sendo as mais comuns as estreptocócicas faríngeas (superantígenos ativando linfócitos T), mas também estão associadas às sinusites, gastroenterites e infecções urinárias (Gudjonsson et al, 2003). Pacientes HIV positivos podem apresentar um agravamento da psoríase, entretanto a frequência da psoríase não aumenta nestes indivíduos (van de Kerkhof; Schalkwijk, 2008). Drogas como o lítio, interferon, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina, antimaláricos, hipnóticos, ansiolíticos, antipsicóticos e a interrupção abrupta de corticoides podem desencadear ou piorar o quadro (Huerta et al., 2007). Estresse psicológico, fatores endocrinológicos como gravidez, hipocalcemia e alterações da vitamina D3, consumo de álcool e fumo também estão associados à piora da doença. Há melhora do quadro cutâneo no verão (Holick et al., 1987; Sampaio; Rivitti, 1998; Gordon; Ruderman, 2006; van de Kerkhof; Schalkwijk, 2008).

1.5 Patogênese

Na patogênese da psoríase estão envolvidos o encurtamento do ciclo germinativo epidérmico, o aumento das células em proliferação e o encurtamento do “turn over” na epiderme, porém, hoje já se sabe que a lesão epidérmica é secundária a um processo imunológico causado por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados, envolvendo tanto a imunidade inata, quanto a adquirida (Bos; de Rie, 1999; Das et al., 2009).

Com o advento de tratamentos como a ciclosporina A (inibidor de linfócitos T) e a fototerapia (que depleta a população de linfócitos T na epiderme), houve a comprovação de que a psoríase é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T. Inicialmente, o padrão de resposta do tipo T “helper” 1 (Th1) foi o principal envolvido na patogênese da doença, apresentando o aumento da quantidade das citocinas TNF alfa (TNF- α), INF gama (INF- γ) e IL-2 e a diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 (Consenso Brasileiro de Psoríase, 2012). Após o uso do ustekinumabe (um anticorpo monoclonal humano contra a subunidade p40 da IL-12 e IL-23) para tratamento da doença, demonstrou-se também a participação de uma nova classe de linfócitos T “helper” CD4+ chamados de Th17, com outro padrão de resposta imune, o padrão T “helper” 17 (Th17). Estas células secretam IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. A IL-23 (produzida por células dendríticas) estimula as células Th17 a secretarem IL-17 e principalmente a IL-22 que, por sua vez, aumenta a proliferação de queratinócitos e a inflamação dérmica, perpetuando o processo (Krueger; Bowcock, 2005; Zheng et al., 2007). O mecanismo para que ocorra a diferenciação de células “naive” em células Th17 é já bem estabelecido através de estudos com camundongos, entretanto, ainda permanece obscuro em humanos. Provavelmente, esta diferenciação seja dependente da expressão do fator de transcrição ROR γ t (um receptor nuclear hormonal). A associação entre o TGF- β e a IL-6 ou a IL-21 são suficientes para iniciar a expressão de IL-17, e a IL-22 é induzida pela IL-6 e inibida por altas concentrações de TGF- β . (Manel et al., 2008; Waite; Skokos, 2012).

A presença de um provável autoantígeno ou superantígeno desconhecido estimula a formação de células T efetoras que infiltram a pele e juntamente com outras células do sistema imune liberam citocinas que induzem as alterações histopatológicas cutâneas características da doença (Rodrigues; Teixeira, 2009). Estudos recentes

sugerem que a IL-20 e a IL-22, membros da família da IL-10, são os principais mediadores das alterações na pele psoriásica. Existe uma grande expressão destas citocinas na pele lesionada, o que não ocorre na pele normal, onde elas são praticamente indetectáveis (Krueger; Bowcock, 2005). A IL-22 está presente no sangue de pacientes com psoríase e se correlaciona com a gravidade da doença (Wolk et al., 2009).

São encontrados, tanto na epiderme como na derme das lesões psoriásicas, linfócitos T ativados (CD4+, CD8+, “Natural Killer”), células de Langerhans imaturas, células dendríticas maduras, mieloides e plasmocitoides, além de macrófagos e neutrófilos (Das et al., 2009; Lima, 2010). As células de Langerhans imaturas estão presentes na epiderme e sua função principal é a captura do antígeno; as células dendríticas mieloides se encontram na derme e secretam IL-2 e IL-23; as células dendríticas maduras apresentam antígenos a células T, por expressarem moléculas envolvidas na ativação das células T, como B7, ICAM-1 e IL-12, e, as células dendríticas plasmocitoides, que liberam IFN- γ , estão associadas à estimulação dos linfócitos T na pele psoriásica (Krueger; Bowcock, 2005). Os linfócitos T CD4+ apresentam predomínio do fenótipo de memória CD45RO+, se encontram principalmente na derme superior com expressão de antígeno cutâneo linfocitário (CLA), que é um ligante para E-selectina expressa nos vasos dérmicos; os linfócitos T CD8+ dificultam a formação de desmossomos entre os queratinócitos através de integrinas que se ligam a E-caderinas na epiderme (Das et al., 2009). Existem, ainda, os linfócitos T “Natural Killer” que sintetizam INF- γ , perpetuando a ação linfocítica no local (Krueger; Bowcock, 2005; Das et al., 2009).

Com a presença de linfócitos T ativados há aumento da produção e secreção de IL-2 (ativa e diferencia o linfócito T), INF- γ (inibe a apoptose de queratinócitos e

aumenta a expressão da ICAM-1 nas células endoteliais), TNF- α (impede apoptose das células dendríticas) e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), o que leva a uma neovascularização dérmica e hipertrofia epidérmica (Mehlis; Gordon, 2004; Krueger, 2005; Gaspari, 2006; Tonel; Conrad, 2009). O INF- γ e o TNF- α agem também sobre os queratinócitos fazendo com que estes produzam IL-8 que, por sua vez, estimula o influxo de neutrófilos para epiderme e, a partir daí, estes neutrófilos liberam mediadores inflamatórios que aumentam a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, perpetuando a quimiotaxia de neutrófilos para a epiderme (Li et al., 2008). Os queratinócitos também produzem a IL-1 β que aumenta os efeitos da IL-17, esta, juntamente com o TNF, estimula os queratinócitos a produzirem os peptídeos antimicrobianos ou catelicidinas (β defensinas, lipocalinas, LL-17, S100H7), que são moléculas efetoras da imunidade inata, além de quimiocinas (CXLL, CXCL, 1,2,3,5 e IL8) e CCL20 que estimulam neutrófilos, células T e células dendríticas, em um ciclo que sustenta a ativação celular (Lande et al., 2007; Jordan et al., 2012). [Figura 1].

Figura 1. Fisiopatologia da Psoríase

O desenvolvimento das placas de psoríase se dá devido à interação das células apresentadoras de antígenos (células de Langerhans, células plasmocitoides e mieloides) com os linfócitos (CD4, CD8 e Natural Killer). Os linfócitos T infiltrantes são ativados pela interação célula-célula, ocorrendo a sinapse imunológica essencial para o reconhecimento do antígeno. Ocorre, assim, a liberação de citocinas do tipo Th1 (IFN, TNF e IL-2) e Th17 (IL-12, IL-22) e quimiocinas que estimularão a quimiotaxia, perpetuando o ciclo imunológico na derme e epiderme. Cedido por Dra. Gladys Martins.

1.6 Família TNF- α

As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a micro-organismos ou outros antígenos, que regulam as reações inflamatórias e imunológicas.

O TNF- α é uma citocina inflamatória pleiotrópica (tem habilidade para agir em diferentes tipos celulares). Ele é um homotrímero com 17kD (TNF solúvel - TNFs) ou 51 kD (TNF transmembrana – TNFtm) sendo o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias, principalmente as gram-negativas (Bazzont; Beutler, 1996). O TNF é sintetizado por vários estímulos como bactérias, vírus, radiações, traumas, complexos imunes, complemento, citocinas e células tumorais. Suas principais fontes celulares são os macrófagos e as células T e os alvos celulares são responsáveis pelos seus efeitos biológicos que podem ser benéficos, quando liberados em baixas concentrações, ou maléficos quando ocorre liberação maciça (Abbas et al., 2008). O TNF ativa células endoteliais e macrófagos levando a inflamação e coagulação, porém, pode causar hipotensão e choque em septicemias (Goedkoop et al., 2004), no hipotálamo causa a febre, no fígado síntese de proteínas da fase aguda, nos músculos e gordura estimula o catabolismo (caquexia) e, em muitos outros tipos celulares, a apoptose (Abbas et al., 2008).

O TNFtm sintetizado pode ser convertido em TNFs através da ação da enzima de conversão do TNF- α (TACE) e quando já na membrana citoplasmática induz a síntese de citocinas como a IL-1, IFN- γ e IL-2 que causam um “feedback” positivo aumentando a síntese do TNF e, como forma reguladora, este mesmo TNF pode aumentar a produção da IL-10, prostaglandinas e corticoides, como “feedback” negativo (Tracey et al., 2008).

A família TNF inclui várias substâncias semelhantes estruturalmente, entre elas estão o TNF- α , a linfotóxina (TNF- β), a ligante de Fas, a ligante de CD40, a ligante de GITR, OX-40, ligante do ativador do receptor de NF- κ B (RANK-L), ligante de indução da apoptose relacionado com TNF (TRAIL) e várias outras proteínas. São consideradas citocinas secretoras e proteínas de membrana que se enovelam em formas triangulares ligando-se a receptores de superfície celulares (Tracey et al., 2008). Os receptores de TNF são glicoproteínas das membranas plasmáticas que estão presentes em quase todos os tipos celulares e são chamados tipo I (TNF-RI com 55 kD) quando apresentam afinidade maior para o TNFs e o TNF-RII (com 75 kD) que liga-se preferencialmente ao TNF μ m, todavia as afinidades entre o TNF e seus receptores são consideradas baixas para uma citocina (Tracey et al., 2008). Além destes, existem muitos receptores de TNF, como o receptor de linfotóxina β (LT-betaR), Fas, CD40, ligante de OX-40, RANK e outros (Ware, 2005). Essa ligação culmina em um recrutamento de proteínas chamadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), para as proximidades dos receptores. Os TRAFs ativam o fator nuclear κ B (NF- κ B) e a proteína-1 de ativação (AP-1) que são fatores de transcrição podendo, a depender da família do receptor ativado, expressar genes (nova transcrição gênica), causar apoptose (com a ação da caspase 8 e da caspase 3) ou ambos (Tracey et al., 2008). A apoptose e o processo inflamatório podem ser inibidos através da ação de estruturas presentes nas caudas citoplasmáticas tanto do TNF-R como de Fas que são chamadas domínio de morte e, a mutação ou a deleção nesta região, evita que as moléculas TNF-RI ou Fas liberem sinais de indução de apoptose. Isso ocorre devido a ação da enzima de conversão da “Fas-associated death domain-like” IL-1 β (FLICE) [Ware, 2005; Abbas et al., 2008]. A principal função fisiológica do TNF é o recrutamento de

neutrófilos e monócitos para o local da infecção ativando-os para a erradicação dos micro-organismos causadores. O processo inicia-se através das células endoteliais expressando moléculas de adesão (selectinas e ligantes para integrinas de leucócitos) que facilitam a passagem dos neutrófilos, monócitos e linfócitos e, posteriormente, o TNF estimula as células endoteliais e macrófagos a produzirem quimiocinas que aumentam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes, induzindo a quimiotaxia de neutrófilos (Bazzoni; Beutler, 1996; Abbas et al., 2008).

Dentro da família do TNF, uma citocina também importante no processo inflamatório é a linfotóxina (LT). Dentre elas se destaca a LT α -3 (antiga TNF- β), que tem estrutura semelhante ao TNFs e se liga tanto ao TNF-RI como ao TNF-RII e a LTA β que, além de se ligar a esses receptores, tem como receptor próprio o LT β R comumente encontrado em fibroblastos, células epiteliais, monócitos, macrófagos, mastócitos e células dendríticas, todavia, ausentes em linfócitos T, B e células “*natural Killers*” (Ware, 2005).

No tocante à psoríase, encontramos produção do TNF nos macrófagos, queratinócitos e células de Langerhans, havendo uma distribuição da citocina por toda epiderme e nas proximidades dos vasos da derme superior (Tracey et al., 2008). Na pele psoriásica, a maior expressão do TNF-RI encontra-se nos queratinócitos, células de Langerhans epidérmicas e nas paredes dos vasos da derme e do TNF-RII principalmente nos vasos dérmicos e células infiltrantes perivasculares (Tracey et al., 2008).

O TNF- α se relaciona com a atividade da doença estando aumentado na pele, plasma e articulações de pacientes psoriásicos (Tutuncu; Kavanaugh, 2005).

Por esse motivo, a administração de medicamentos biológicos anti-TNF- α mostrou-se eficaz na redução das lesões e do processo inflamatório causado pela psoríase.

Independente da estrutura, farmacocinética e mecanismo de ação de cada droga i-TNF- α , todas elas podem resultar em melhora do quadro clínico (Silva et al., 2010a).

1.7 Quadro clínico e diagnóstico

Clinicamente, a psoríase caracteriza-se por placas eritemato-escamosas com descamação branco-prateada, tipicamente distribuídas de forma simétrica no couro cabeludo, cotovelos, joelhos, região lombo-sacra e regiões extensoras (Callen et al., 2003; Lui; Mamelak, 2007). Quando acomete dobras é denominada psoríase invertida, podendo também, ocorrer em áreas de trauma (fenômeno de Koebner). O tipo mais frequente é a psoríase em placas (80% dos casos) [Sampaio; Rivitti, 1998; Lui; Mamelak, 2007]. Em 50 a 80% dos casos identificamos o comprometimento das unhas, que se apresentam com onicólise, hiperqueratose subungueal e depressões cupuliformes. A psoríase em gotas ocorre com mais frequência em adolescentes e adultos jovens, muitas vezes após quadros infecciosos (Gudjonsson et al., 2003). A forma pustulosa pode ser localizada (palmoplantar) ou generalizada (Von Zumbusch) [De Rie et al., 2004]. A psoríase artropática ocorre entre 6 a 40% dos doentes, não apresentando relação com a gravidade da doença cutânea, mas, pode estar associada a lesões ungueais, dactilites e entesites, o que auxilia no diagnóstico precoce da artrite (Consenso Brasileiro de Psoríase, 2012). Geralmente é artrite soronegativa para fator reumatoide, sendo a forma mais comum a artrite reumatoide (AR) símile (50%), em seguida a mono ou oligoartrite assimétrica (35%), em articulações interfalangeanas distais ou proximais (5%); raramente pode ocorrer artrite mutilante (5%) e espondilite ou sacroileite (5%)

(Callen et al., 2003; Consenso Brasileiro de Psoríase, 2012) . A psoríase eritrodérmica pode ocorrer no curso evolutivo em qualquer uma das outras formas. A evolução da doença é crônica, há períodos de exacerbação e melhora, com gravidade e curso variáveis (Sampaio; Rivitti, 1998; Callen et al., 2003; De Rie et al., 2004).

Nas últimas décadas tem-se observado uma diminuição da incidência de outras doenças cutâneas em pacientes com psoríase quando comparado à população geral, como por exemplo: acne, urticária e dermatite atópica; enquanto a associação com doenças não cutâneas aumentou significativamente nestes indivíduos (Henseler; Christophers, 1995; Pearce et al., 2005). À semelhança do que ocorre em outras desordens inflamatórias imunomediadas como a AR (Sebbag et al., 1997; Kaplan, 2008) e o lúpus eritematoso sistêmico (Rajagopalan et al., 2004), a psoríase também está associada ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (Azfar; Gelfand, 2008), incluindo seus componentes: obesidade, dislipidemia, elevação da pressão arterial e *diabetes mellitus*/resistência insulínica. Estas entidades possivelmente dividem mecanismos etiopatogênicos similares, que envolvem a inflamação crônica e o descontrole na secreção de citocinas pró-inflamatórias, angiogênese, “stress” oxidativo e suscetibilidade genética, os quais são tipicamente encontrados nas doenças inflamatórias imunomediadas (Mrowietz et al., 2007).

A psoríase e a artrite psoriásica são caracterizadas por ciclos de remissão e exacerbação, com importante impacto sobre a qualidade de vida do paciente (Gisondi; Girolomoni, 2009). Isto gera forte preocupação acerca dos prejuízos sistêmico da psoríase, que seguindo uma tendência dos estudos mais recentes, não deve ser vista como uma doença confinada à pele, e sim, uma condição inflamatória mais complexa (Rocha-Pereira et al., 2004; Kaplan, 2008).

A presença de comorbidades cardiovasculares tem importância relevante na terapia e melhora global dos pacientes com psoríase. O tratamento com agentes anti-psoriásicos sistêmicos frequentemente atenuam os efeitos das comorbidades cardiometabólicas (Azfar; Gelfand, 2008; Gisondi; Girolomoni, 2009). Assim, pacientes com psoríase devem ser efetivamente tratados e encorajados a corrigir fatores de risco cardiovasculares modificáveis.

O diagnóstico é realizado através da história e do quadro clínico. Na psoríase em placa é típico o sinal da vela e do orvalho sangrante após a curetagem metódica de Brocq (Sampaio; Rivitti, 1998). Em casos menos típicos realiza-se o exame anatomopatológico da lesão de pele, onde se encontra hiperqueratose com parakeratose, agranulose e infiltração de neutrófilos na epiderme (microabscessos de Munro), além de plexo vascular dérmico pronunciado, células inflamatórias na derme superficial e na epiderme (de Rie et al, 2004).

O escore mais utilizado para avaliação da gravidade da doença extensa é o PASI (“*Index*” de área e gravidade da psoríase), que é a medida média do eritema, infiltração e descamação das lesões considerando cada área afetada do corpo (Figura 2) [Langley; Ellis, 2004]. Para se avaliar a efetividade de um medicamento para psoríase, considera-se eficaz se houver melhora de 75% no escore PASI, ou seja, PASI 75.

Para se definir qual o melhor tratamento de um paciente, além do quadro clínico, temos vários instrumentos para avaliação da qualidade de vida do doente. Na psoríase, esta qualidade de vida revela um impacto negativo, que se assemelha a qualidade de vida de pacientes com doenças graves como o câncer e doenças cardíacas, *diabetes mellitus* e depressão (Rapp et al., 1999; Smith et al., 2005; Mease; Menter, 2006). No Brasil, Martins e colaboradores (2004) fizeram a validação para a

língua portuguesa de dois questionários: PDI (“Psoriasis Disability Index”) e DLQI (“Dermatology Life Quality Index”), que, associados ao PASI proporcionam uma boa noção da eficácia terapêutica (Finlay et al., 1990; Finlay; Khan, 1994; Martins et al., 2004; Gordon; Ruderman, 2006).

O DLQI tem sido o mais utilizado. É um questionário de fácil preenchimento e composto por 10 questões de autoavaliação relacionadas a sintomas, sentimentos, atividades como lazer, trabalho ou escola e, também, relação pessoal e efeitos colaterais do tratamento que ocorreram na semana anterior ao preenchimento do questionário. Cada questão tem respostas com pontuação que variam de 0 a 3 e que são somadas no final. O total varia de 0 a 30, sendo que quanto maior a pontuação pior a qualidade de vida. O DLQI maior que 10 está relacionado à psoríase grave, sendo indicado, nestes casos, o tratamento sistêmico (Finlay et al., 1990; Finlay; Khan, 1994; Martins et al., 2004; Consenso Brasileiro de Psoríase, 2012).

Tabela 2. Medida do PASI

Unidade	Eritema	Infiltração	Descamação	Soma	X área % C	Produto	X Constante	Total
Cabeça	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,1	
Tronco	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,2	
MMSS	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,3	
MMII	0 a 4	0 a 4	0 a 4	0 a 12	1 a 6	=	0,4	
Total								PASI = 0 a 72

Adaptado de: Consenso brasileiro de psoríase, 2012

Escala de avaliação de cada item: eritema, infiltração e descamação:

- 0 = Ausente
- 1 = Leve
- 2 = Moderado
- 3 = Grave
- 4 = Muito grave

Escala de avaliação de área:

- 1 = mais que 10%
- 2 = 10 a menos de 30%
- 3 = 30 a menos que 50
- 4 = 50 a menos que 70%
- 5 = 70 a menos que 90%
- 6 = 90 a 100%

1.8 Tratamento

A indicação para o uso de imunobiológicos na psoríase é estabelecida por “guidelines” em diversos países. No Brasil, seguimos o Consenso Brasileiro de Psoríase (2012) que o indica como terapêutica na psoríase recalcitrante, quando o paciente apresenta intolerância ou fracasso à terapia sistêmica ou contra-indicação à terapia sistêmica clássica, em pacientes com grave deteriorização da qualidade de vida e/ou incapacidade física, e também, na artrite psoriásica com comprometimento articular axial, dactilite e/ou entesite.

As terapias biológicas mostraram-se eficazes não apenas no tocante a sinais e sintomas da doença, mas também, na melhora da qualidade de vida dos doentes. Todavia, são relativamente dispendiosas, devendo ser introduzidas de maneira planejada para proporcionar seus benefícios aos pacientes (Mease; Menter, 2006). Dentre elas, as drogas i-TNF- α para o uso na psoríase e na artrite psoriásica estão o infliximabe, o etanercept, o adalimumabe, o certolizumab pegol e o golimumab (Shealy et al., 2008; Silva et al, 2012a).

1.9 Infliximabe

O Infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino (Knight et al, 1993; Calabrese, 2003), da classe Ig G1, produzido por engenharia genética a partir de células recombinantes cultivadas sob perfusão contínua. Liga-se a formas solúveis e transmembrânicas do TNF- α , mas não à linfotoxina α (TNF- β)

(Maini et al., 1997; Moreland et al., 1997). Este tratamento inibe a atividade funcional do TNF- α , formando rapidamente complexos estáveis, um processo paralelo à perda de bioatividade do TNF- α , por isso é chamado de i-TNF- α (Gottlieb et al., 2004). O pico de concentração sanguínea do infliximabe chega a 80 microg/mL (Solovic et al., 2010).

O “cross-linking” da forma transmembrânica de TNF- α pelo infliximabe leva à morte celular de alguns tipos de células em certas condições clínicas, (ex.: linfócitos infiltrantes da mucosa intestinal na doença de Crohn; macrófagos nas articulações de pacientes com artrite reumatoide). Este “cross-linking” também causa a morte celular por apoptose através da ativação da caspase-3. Este mecanismo ainda não está bem estabelecido. Acredita-se que haja a formação de um complexo que, através de sinalização reversa, estimula a forma inativa da caspase-8, o que resulta na ativação da caspase-3, levando a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria, com a desintegração do DNA, culminando no processo apoptótico (Lugering et al., 2001; Scallon et al., 2002; Calabrese, 2003; Van den Brande et al., 2003; Di Sabatino et al., 2004; Catrina et al., 2005; Silva et al., 2012).

Zou et al. (2003) realizaram um estudo com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com espondilite anquilosante, antes e após o tratamento com infliximabe e verificaram que, após doze semanas de tratamento, havia uma significativa redução no número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ secretores de citocinas como o IFN- γ e o TNF- α , com consequente redução da sua produção. No entanto, não houve diminuição no número de células secretoras de IL-10 e IL-4, bem como de TNF- α secretado por monócitos.

A terapia com infliximabe, num período de seis semanas, resulta em uma rápida redução na inflamação e normalização da diferenciação dos queratinócitos nas

placas psoriásicas (Chaudhari et al., 2001; Gottlieb, et al., 2003; Victor et al., 2003). Após dez semanas, a expressão de moléculas de adesão (ICAM) induzida pelo TNF- α e IFN- γ é cessada. Há a diminuição da espessura da epiderme das placas psoriásicas, indicando uma redução de linfócitos na região (Gottlieb et al., 2003).

A utilização de agentes biológicos contribuiu para o controle de doenças inflamatórias crônicas, como a AR, artrite psoriásica, doença de Crohn, e mais recentemente, da psoríase (Mease et al., 2000; Gordon et al., 2003; Krueger; Callis, 2003), todas elas tendo como denominador comum a importante participação de TNF- α na sua imunopatogênese. A ação benéfica do infliximabe na psoríase foi relatada pela primeira vez, no ano de 2000, em um paciente apresentando a associação de doença de Crohn e psoríase, a medicação foi introduzida devido à doença intestinal com melhora acentuada do quadro cutâneo (Solovic et al., 2010). A utilização do infliximabe para psoríase é realizada na dose de 3 a 10 mg/kg/dose, mas geralmente utiliza-se 5 mg/kg/dose com esquema de indução, onde a medicação é aplicada na semana 0, 2 e 6 e posteriormente a cada 8 semanas (Solovic et al., 2010). A falência terapêutica pode ser minimizada fazendo-se um esquema de uso regular da medicação ao invés do uso intermitente e, também, a associação de baixas doses de MTX parece ser benéfica. Essa diminuição da eficácia pode estar relacionada à formação de anticorpos antinucleares (Solovic, 2010). O infliximabe é muito eficaz para psoríase levando a uma melhora de 75% das lesões (PASI 75) em mais de 70% dos pacientes num período de 12 semanas (Solovic, 2010). É relatada a melhora da psoríase em placas, psoríase pustulosa generalizada e ungueal, porém, a psoríase pustulosa palmoplantar parece não responder ao tratamento, inclusive, existem relatos de aparecimento deste quadro após o uso de drogas i-TNF- α (Collamer et al., 2008).

Na psoríase, considera-se a sua utilização em adultos quando a doença é moderada a grave, com PASI > 10, DLQI >10 ou BSA (“body surface área”) >10 (Callen et al., 2003; Sterry et al., 2004; Smith et al., 2005). Por outro lado, o emprego dessas substâncias está sendo associado ao aumento dos casos de reativação de Tb nos países desenvolvidos, onde esta modalidade de tratamento tem sido mais utilizada (Victor; Gottlieb, 2002; Gardam et al., 2003; Long; Gardam, 2003; Listing et al., 2005). Isso ocorre devido ao TNF- α aumentar a capacidade fagocítica dos macrófagos e a morte de bactérias viáveis intracelulares através da geração de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio que agem sinergicamente com o INF. Quando o TNF- α é neutralizado ocorre a retomada do crescimento das micobactérias dentro dos granulomas (Gardam, et al., 2003; Listing et al., 2005). Além disso, o TNF- α aumenta a produção de quimiocinas pelos macrófagos e células T, induzindo a expressão de moléculas de adesão intravascular e promovendo o acúmulo de células do sistema imune no foco da infecção. Sendo assim, o TNF- α é responsável pelo início e pela manutenção da integridade do granuloma (Solovic, et al., 2010; Sivamani et al., 2012).

Trabalhos realizados nos EUA e Europa (países não endêmicos para Tb) demonstraram que pacientes tratados com infliximabe tiveram risco de 5 a 10 vezes maior para reativação da Tb quando comparados com a população não tratada com a droga (Wallis et al., 2004; Gomez-Reino et al., 2007).

Alguns estudos recentes sugerem que os i-TNF- α possam causar até uma possível síndrome da reconstituição imunológica, semelhante ao uso dos antirretrovirais em pacientes HIV positivos, porém, isso ainda não apresenta implicações maiores no tocante a cuidados devido ao risco aumentado de Tb (Solovic et al., 2010).

1.10 Tuberculose

A Tb é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mtb*. É doença encontrada em quase todos os países do mundo, sendo que cerca de 10 milhões de pessoas são infectadas por ano e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo menos dois milhões morrem anualmente. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada e com risco de desenvolver a doença (WHO, 2009; WHO, 2010).

No ano de 2010, a incidência da doença foi de 8,8 milhões de habitantes. Houve 1,1 milhões de mortes entre pessoas HIV negativas e mais 0,35 milhões de mortes em HIV positivos (WHO, 2010). A maior incidência da doença ocorre no terceiro mundo, sendo que, nos países que estão na Ásia e África, este índice é ainda mais preocupante. O Brasil faz parte dos 22 países que concentram 80% dos casos do mundo e, em 2008, segundo a OMS, o 19º país da lista. No Brasil, a Tb é doença de notificação compulsória sendo considerada, ainda, problema de saúde pública com cerca de 57 milhões de pessoas infectadas e sendo identificadas anualmente cerca de 71 mil novas infecções, além de 4800 mortes notificadas em 2010. A incidência em 2011 foi de 37,1 casos/100.000 habitantes, 60% deles concentrando-se nos 181 maiores municípios do país (Piller, 2012; PNCT). No Estado de São Paulo a incidência em 2008 foi de 39 casos/100.000 habitantes e em 2011 foi de 41,3 casos/100.000 habitantes e na região de Presidente Prudente, onde residem os pacientes deste estudo, a incidência da Tb no ano de 2008 foi de 27 casos/100.000 habitantes, taxa esta considerada alta quando comparada a outras cidades do país (DataSus). A falta de saneamento, a diminuição de verbas para o setor da saúde e a pandemia do HIV causam impacto negativo sobre a doença. Agora, com o advento dos

imunobiológicos, esta situação pode ser agravada, porém existem poucos dados na literatura sobre este assunto.

A Tb é uma doença granulomatosa que se desenvolve após a contaminação do indivíduo através de perdigotos contendo as bactérias. Estas se depositam nos espaços alveolares e são fagocitadas por macrófagos, que são as células consideradas as mais importantes para o controle da infecção. Dentro deles, os fagossomas são os responsáveis pela destruição das bactérias e tentam manter um pH adequado para sua maturação e fusão com os lisossomas, ocorrendo então a lise bacteriana. Este processo é estimulado através do INF- γ (Hernandez et al., 2008). Caso a micobactéria consiga neutralizar o pH lisossômico pode ocorrer disseminação da doença para outros órgãos através dos macrófagos contaminados e, quando eles chegam aos linfonodos, desencadeiam várias respostas celulares, promovendo apoptose desses macrófagos, e assim, contendo a doença. Cerca de 5% dos infectados não conseguem uma resposta eficaz e desenvolvem a doença após um a dois anos da contaminação (Chan et al., 1995; Flynn et al., 1995; Ladel et al., 1997; Hernandez et al., 2008).

O granuloma é formado por linfócitos (TCD4+ e TCD8+, bem como B), que circundam os macrófagos com o *Mtb*. Fibroblastos e outras células podem estar presentes no interior do granuloma que tem três principais propósitos: formar um aglomerado de células do sistema imunológico para melhor destruição das micobactérias, manter foco de células inflamatórias que previne a disseminação da doença e formar uma barreira impedindo a disseminação do bacilo (Flynn, et al., 1995; Shams et al., 2001).

A resposta imune ao *Mtb* é complexa e envolve vários componentes do sistema imune. A IL-12 é produzida, após a fagocitose do *Mtb*, por macrófagos e células

dendríticas, e estimula a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ . Há também a ativação dos linfócitos TCD8⁺, que podem liberar citocinas como o IFN- γ e o TNF- α ou atuar como células citotóxicas (Ladel et al., 1997; Shams et al., 2001).

O IFN- γ desempenha um papel importante na ativação dos macrófagos. O TNF- α , quando sozinho mostra-se ineficaz, todavia em sinergia com o IFN- γ induz o mecanismo efetor responsável pela atividade micobactericida através da produção do óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de nitrogênio (RNIs) pelos macrófagos (Chan et al., 1995; Flynn et al., 1995; Ladel et al., 1997).

O *Mtb* induz a secreção de TNF- α por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (Flynn, et al., 1995; Garcia et al., 1997; Henderson et al., 1997), estimulando assim a migração das células para o interior dos tecidos infectados, influenciando a expressão de moléculas de adesão, com a produção de quimiocinas e estímulo dos seus receptores e isto certamente afeta a formação do granuloma (Barnes, et al., 1993; Ladel et al., 1997; Serbina; Flynn, 1999). Dessa forma o TNF- α e IFN- γ atuam em sinergismo na formação e manutenção do granuloma (Orme et al., 1992).

A terapia com as drogas i-TNF- α resulta em redução da expressão de granulinas pelas células T, causando deficiência na proteção contra bactérias intracelulares (Solovic et al., 2010). Assim, é esperado que o uso de i-TNF- α , ao inibir a atividade do mesmo, propicie a reativação da Tb, uma vez que interfere com a resposta imune celular do hospedeiro, que visa manter a micobactéria em focos quiescentes (Appel et al., 2007). Além disso, existem trabalhos sugerindo que na psoríase há uma resposta imunológica regulatória anormal das células CD4⁺, com evidências de que muitos casos da doença podem ter envolvimento de micobactérias

em sua etiologia (Bay et al., 1998). O risco relativo de um paciente com AR ter Tb varia entre dois a 16, inerente à própria doença e ao uso de outras medicações não biológicas; já o risco relativo para o desenvolvimento de Tb em indivíduos que utilizam drogas i-TNF- α está em aproximadamente duas a 25 vezes, dependendo da doença de base e da droga utilizada e, a maioria das reativações ocorre próxima ao início do tratamento, apresentando progressão rápida da Tb nestes doentes (Solovic et al., 2010). A quimioprofilaxia pode diminuir o risco da doença em pacientes com Tb latente, diagnosticados através da positividade da resposta imune específica ao *Mtb* através do teste intradérmico cutâneo (TT) ou, “*in vitro*”, com o “interferon α release assay” (IGRA) (Pai et al., 2006; Solovic et al, 2010).

A maioria dos casos de Tb ativa em pacientes durante o uso de drogas i-TNF- α é devido à reativação da infecção latente. O diagnóstico da Tb latente se faz através de um TT positivo na ausência de manifestações da doença, porém, este teste apresenta baixa sensibilidade em pacientes com AR e pode ser falso positivo em pacientes previamente vacinados com BCG ou infectados com outros tipos de micobactérias (Pai et al, 2005). As diretrizes para o diagnóstico de Tb latente em todos os pacientes antes do uso de i-TNF- α incluem a pesquisa de possível exposição a contactantes com Tb, história de Tb prévia, TT e radiografias do tórax (Gardam et al., 2003). A reatividade ao TT e as alterações radiográficas são consideradas como indicativas de infecção pelo *Mtb*. A profilaxia era feita com a utilização de isoniazida por um período de seis meses, se aconselhado que a profilaxia fosse concluída antes do início do tratamento com os i-TNF- α (Gardam et al., 2003; Long; Gardam, 2003), hoje administra-se a isoniazida 300 mg/dia por seis meses ou isoniazida + rifampicina por quatro meses ou rifampicina por três meses e retarda-se o início da administração da droga i-TNF- α por

um período de apenas quatro semanas, garantindo-se, assim, uma abordagem segura (Solovic et al., 2010). Um estudo espanhol demonstrou diminuição da incidência de Tb em 98% quando comparada a do período antes do tratamento profilático para Tb latente (Gomez-Reino et al., 2007) e, além da profilaxia ser realizada nos pacientes acima, deve-se considerar, também, a sua utilização em indivíduos com fibrose pulmonar, silicose, *diabetes mellitus* e HIV positivos, porém, ainda não está estabelecida para fumantes e obesos (Solovic et al., 2010). Estas mesmas diretrizes são aplicadas no Brasil sem, entretanto, levar em conta o diferente estado imunitário de nossa população, decorrente da frequente exposição ao *MTb*, da vacinação obrigatória (>90% de cobertura) com BCG e o fato de que a positividade ao TT não obrigatoriamente indica infecção por *Mtb* (Tanji, 2005). Além disto, supomos que, em pacientes com psoríase, como na AR, exista uma deficiência na resposta imune celular, dificultando mais ainda o uso corrente do TT como teste para triagem (Bay et al., 1998; Solovic et al., 2010). Em estudo realizado no Peru, onde a Tb é endêmica, houve 29% de positividade do TT em pacientes com AR, enquanto no grupo controle, constituído de indivíduos sadios, esta positividade chegou a 71% (Ponce de León et al., 2005). Laffitte et al. (2009), mostra uma incidência de 20% de Tb latente em pacientes com psoríase na Suíça. No Brasil, de Andrade Lima (2011) demonstra TT positivo em apenas 18% dos casos com psoríase, comparado a 53% de positividade no grupo controle em um país onde a população adulta saudável apresenta 51% de positividade no TT (Silva et al., 2009).

1.11 Métodos para a avaliação de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)

O TT é usado há mais de um século e baseia-se em uma resposta de hipersensibilidade tardia a aplicação intradérmica do derivado proteico purificado (PPD), um extrato de sobrenadante estéril do filtrado da cultura do *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). O teste é medido em milímetros no seu maior eixo de endureção, de 48 a 72 horas após a sua realização (Lalvani et al., 2001).

No Brasil utiliza-se 0,1 ml (2 UT) do PPD RT23, que equivale a 5 UT de PPD-S utilizado em outros países, em aplicação intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo com leitura realizada 72 horas após a aplicação, considera-se reator quando a pápula formada no local da aplicação tem mais que 5 mm. Um resultado entre 5 a 9 mm é frequente em indivíduos vacinados com a BCG ou infectados pelo *Mtb* ou outras micobactérias, e quando a pápula apresenta diâmetro maior ou igual a 10 mm significa que o paciente foi infectado pelo *Mtb* e pode se apresentar doente ou não e, ainda, podem ter recebido a vacina com a BCG há menos de dois anos (Ministério da Saúde/Funasa, 2002). Este exame apresenta algumas limitações tais como a baixa especificidade, por apresentar reações cruzadas com o bacilo de Calmette-Guérin (vacina BCG) e outras micobactérias, causando resultados falsos positivos (Lee et al., 2010); a dificuldade da anergia cutânea em pacientes imunocomprometidos, causando resultados falso-negativos; a variabilidade na leitura do teste que depende do observador e, ainda, a utilização do reforço do TT (efeito booster) reduzir a eficácia como exame marcador da Tb latente (Kang et al., 2005; Kim et al., 2009).

Mais recentemente houve o desenvolvimento de exames “*in vitro*” onde se demonstra a resposta imune celular específica contra o *Mtb*. Estes testes são realizados

como rotina em alguns países e são mais vantajosos operacionalmente, apresentando acurácia diagnóstica maior que o TT. Isto ocorre devido à identificação de segmentos genômicos do *Mtb* (regiões de diferença – RD 1 e 11), os dois antígenos proteicos: “early secreted antigenic target” 6 (ESAT-6) com 6 kDa e a “culture filtrate protein” 10 (CFP10) com 10 kDa, que são derivados do RD1 e o TB7.7 do RD11 que são potentes estimuladores da resposta TH1 (Pai et al., 2008). Nestes exames as células do sangue periférico são estimuladas com antígenos específicos, as células T efectoras reconhecem o antígeno e ativam a liberação de citocinas algumas horas após a estimulação. Como o INF- γ é o melhor marcador para a ativação específica das células T e é amplamente utilizado para detectar respostas específicas contra o *Mtb*, estes ensaios foram denominados ensaios de liberação de INF (IGRA) (Solovic et al., 2010).

Os IFNs são glicoproteínas da classe das citocinas produzidas e liberadas por vários tipos celulares em resposta à presença de agentes patogênicos, tais como vírus, bactérias, parasitas ou células tumorais. Eles permitem a comunicação entre as células para a defesa do organismo e têm essa nomenclatura devido a capacidade de “interferirem” com a replicação viral dentro das células hospedeiras. Desempenham também outras funções, como ativarem células do sistema imunológico e regularem a apresentação dos antígenos aos linfócitos T. A sua classificação se dá com base no tipo de receptor através do qual o sinal é transmitido à célula. O INF tipo I se liga a um complexo de receptor específico da superfície celular conhecido como receptor de INF- α (INFAR), nos humanos temos nesta classe o INF- α , o INF- β e o INF- ω . O INF tipo II tem como receptor o INFGR, nos humanos este é o INF- γ (Abbas et al., 2008).

A porcentagem de células sanguíneas liberadoras de INF- γ pode ser determinada usando-se o ensaio “Enzyme Linked Immunospot” (ELISPOT) que é comercializado com o nome de ELISPOT T-SPOT.TB® (Immunotec Oxford, Oxford,

Reino Unido) ou a quantidade de INF- γ liberado no sobrenadante pode ser medida através do ELISA comercializado como QuantiFERON® TB Gold in-tub (Cellestis Ltd, Carnegie, Austrália). Além destes, o INF- γ acumulado dentro da célula pode ser detectado por citometria de fluxo (Pai et al., 2006).

A sensibilidade do IGRA é superior ao do TT e os resultados do IGRA não são alterados por infecções causadas pela maioria das outras micobactérias, além do que, não existe nestes métodos os antígenos do *M. bovis* (Bacilo de Calmette-Guérin), havendo maior especificidade para indivíduos vacinados com a BCG (que podem ser falso positivo no TT) (Pai et al., 2006; Pai et al., 2008). Apresenta maior sensibilidade em pacientes imunossuprimidos, que poderiam ter o TT falso negativo e, neste caso, o método ELISPOT mostrou-se mais específico que o ELISA (Huebner et al., 1993; Pai et al., 2008). Uma das vantagens operacionais dos ensaios “*in vitro*” para imunossuprimidos é a existência não apenas do controle negativo que permite a avaliação da reatividade não específica, mas também, a presença de estímulos mitogênicos usados como controle positivo, para avaliar a resposta geral das células T. A redução da resposta mitogênica neste pacientes é diretamente proporcional à imunossupressão global dos mesmos, sendo assim, tais exames são capazes de diferenciar a resposta negativa verdadeira da anergia (Kwakernaak et al., 2011). O valor preditivo positivo do IGRA para o desenvolvimento da Tb é melhor que a positividade do TT, porém, seu valor preditivo negativo ainda não é conhecido. Até que isso seja esclarecido, este método não deve ser usado como teste único no diagnóstico de Tb latente, e, nenhum deles até o momento consegue distinguir Tb latente, Tb ativa ou Tb previamente tratada (Pai; Menzies, 2007; Solovic et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

O tratamento com drogas i-TNF- α na psoríase está marcando uma nova etapa no tocante a terapêutica e melhora da qualidade de vida destes pacientes. Todavia, efeitos adversos como as infecções e, dentre elas principalmente a Tb, requerem atenção e cuidados especiais antes da sua prescrição. O rastreamento da Tb latente e o acompanhamento com exames específicos durante todo o tratamento é necessário em todos os prováveis candidatos ao uso da droga.

Diante deste cenário, o propósito do trabalho é avaliar a resposta imune celular ao *Mtb* nos pacientes psoriásicos durante o tratamento com infliximabe por meio da avaliação do INF- γ .

A terapia com agentes biológicos está sendo cada vez mais utilizada em nosso meio. Por sermos considerados país com alta prevalência de Tb, devemos estar mais atentos ao risco desta doença em nossa população, pois sabemos que medicamentos i-TNF- α estão associados a uma reativação da Tb em países nos quais a prevalência da doença é relativamente baixa (Silva et al., 2010b).

O atual trabalho se faz importante já que os resultados dos estudos sobre a resposta imune anti-Tb em pacientes tratados com i-TNF- α são controversos e, também, não se sabe sobre a influência do bloqueio do TNF- α na resposta imune anti-Tb nestes pacientes.

3 OBJETIVO

Estudar a resposta imune “*in vitro*” específica ao *Mtb*, através da utilização do método ELISPOT em pacientes com psoríase moderada a grave, reatores ou não ao TT, antes do início do tratamento com infliximabe, e uma, quatro e oito semanas após o término da fase de indução da medicação e, ainda, após 24 semanas do início do tratamento, quando o paciente se mantiver em uso da medicação.

4 CASUÍSTICA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (protocolo número 0467/08).

Foram obtidos os consentimentos informados, aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de todos os pacientes voluntários.

Os pacientes com psoríase moderada a grave, elegíveis para uso de medicamentos i-TNF- α , foram triados no consultório médico particular do autor, no período de 2007 a 2009.

Os exames laboratoriais, incluindo o TT e os exames radiológicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas Marlene Spir e Instituto de Radiologia de Presidente Prudente.

Os exames imunológicos específicos foram realizados no Laboratório de Investigação em Imunodeficiências e Dermatologia, Unidade 56 (LIM 56) do HC-FMUSP.

Os critérios de inclusão foram pacientes com $\geq 10\%$ de comprometimento da área corpórea, PASI ≥ 10 que seguiram o algoritmo de tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia e sem contraindicações para o uso do infliximabe que não fizeram tratamento sistêmico prévio por período de no mínimo três meses.

Os critérios de exclusão foram pacientes com ICC, infecções graves, neoplasias ou história de doenças desmielinizantes.

4.1 Pacientes

Foram estudados longitudinalmente 12 pacientes adultos da região de Presidente Prudente – SP, com psoríase moderada a grave (acometimento igual ou superior a 10% da superfície corpórea) [Guenther et al., 2004], sem artrite associada e sem terapêutica sistêmica prévia num período de três meses anteriores à coleta dos exames e ao início do tratamento com infliximabe. A pesquisa para Tb latente foi baseada na anamnese, exame clínico, radiografia de tórax e TT.

Durante a anamnese buscou-se na história pregressa fatores de risco para Tb, incluindo sintomas respiratórios, antecedentes de tratamento para Tb e contatos recentes com pacientes apresentando Tb ativa. O TT foi realizado segundo o método de Mantoux com aplicação de 0,1 ml da solução que equivale a 02 UT (unidades tuberculínicas) no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. A procedência do reagente do PPD foi do “Serum State Institute”, Copenhagen, Suécia, sendo sua leitura realizada 72 horas após a aplicação intradérmica do produto, com o método de palpação do máximo diâmetro transversal da induração, mensurada através de réguas milimetradas próprias para este fim, com resultado expresso em milímetros. A leitura foi realizada por um único examinador, em todos os pacientes, treinado especificamente para este fim. Foi considerado positivo um resultado acima de cinco milímetros.

Os pacientes incluídos no estudo estavam com hemograma, funções hepática e renal normais, sorologia para hepatite B, C, e HIV negativas e radiografia de tórax normal. Foram excluídos do estudo pacientes com insuficiência cardíaca, infecções graves como Tb, septicemia, abscessos e infecções oportunistas. Foram imediatamente incluídos no estudo os pacientes que obedeceram aos critérios acima e não

apresentaram reatividade ao TT (< 5 mm de induração). Quatro pacientes apresentaram reatividade ao TT e foram submetidos à quimioprofilaxia com isoniazida por seis meses ou rifampicina por três meses, e iniciaram o tratamento com infliximabe apenas pelo menos após um mês do início da droga. Os indivíduos avaliados neste estudo, em sua maioria, apresentaram TT negativo, provavelmente devido a condições sócioeconômicas dos mesmos, já que os pacientes triados são considerados cidadãos de classe social média em nosso país.

As infusões intravenosas de infliximabe foram realizadas na dose de 5 mg/kg, nas semanas 0, 2 e 6, e, a partir de então, em intervalos de 8 semanas. As coletas de sangue foram realizadas antes da primeira infusão e nas semanas 7 (uma semana após a 3ª aplicação), 10 (quatro semanas após a 3ª aplicação) e 14 (antes da 4ª aplicação), para avaliação dos pacientes no período imunológico crítico, após a indução da medicação até a proximidade da dose de manutenção da droga. Fizemos, também, uma coleta de cada paciente que permaneceu em uso da medicação, após seis meses de tratamento, antes da 5ª infusão, para avaliação da imunidade específica após longo tempo de tratamento (Figura 2).

Figura 2. Desenho do estudo

5 MÉTODOS

5.1 Antígenos

Nos ensaios imunológicos utilizamos antígenos específicos ESAT-6 e o CFP-10 (parte integrante do kit T-SPOT-TB, Oxford, England), PPD (Serum Staten, Copenhagen, na concentração ótima de 10 µg/ml conforme padronização prévia em nosso laboratório), o superantígeno enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (SEB) na concentração de 1 µg/ml (Sigma Aldrich, MO, USA), lisado viral do citomegalovírus (CMV) na concentração de 10 µg/ml (doado pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP - IMT-USP) e o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) na concentração 2,5 µg/ml (Gibco BRL, NY, USA).

5.2 Separação e armazenamento das células mononucleares

Foram colhidos 50-60 ml de sangue dos pacientes em tubo estéril heparinizado em cada momento estipulado do tratamento. O sangue foi depositado sobre um gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque), centrifugado a 860 g (Beckman Model J-6B centrifuge, USA) por vinte minutos. Foi recolhido o anel de células mononucleares, e as células lavadas em solução salina por duas vezes. As células foram ressuspensas com 1 ml de meio de cultura RPMI 1640 e foram contadas com a utilização de um contador hematológico automático (*Abbott Cell Dyn 1400, USA*), obtendo-se cerca de 40 a 50 milhões de células mononucleares a cada coleta. O congelamento das células foi realizado

com meio contendo 30% RPMI 1640, 60% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brazil), e 10% dimetil sulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha,) sendo a concentração de células para cada criotubo de $\sim 10 \times 10^6$ células por ml, os quais foram rapidamente congelados em freezer -80°C . A seguir, estas alíquotas foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso, no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências do Hospital das Clínicas – USP – São Paulo. No dia do experimento, um ou dois criotubos foram descongelados rapidamente em banho aquecido a 37°C , e a suspensão de células ressuspendida em 15 ml de RPMI enriquecido com 10% de SFB e mantida em banho aquecido por 10 minutos. Após duas lavagens, a suspensão celular foi reajustada para $2,5 \times 10^6$ células por ml em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro AB humano (Sigma) para o ensaio ELISPOT. A viabilidade celular foi realizada com o uso do corante vital Azul de Tripan em câmara de Neubauer, e esteve sempre acima de 95% após a separação celular e acima de 80% após o descongelamento. Todas as amostras de um mesmo paciente foram avaliadas simultaneamente a fim de minimizar a variabilidade inter-ensaio, facilitando a análise comparativa entre os diversos momentos do tratamento.

5.3 Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ (ELISPOT) com CFP-10 e ESAT-6

Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (T-SPOT-TB, Oxford, England).

A placa foi preparada com o anticorpo monoclonal contra INF. Em cada um dos poços foi adicionado 250.000 células mononucleares periféricas e 50 µL dos antígenos e dos controles positivo e negativo. Em seguida, a placa foi incubada a 37° C, com 5% de CO₂, por 16 a 20 horas, para permitir o reconhecimento dos antígenos pelas células T efectoras. Após este período de incubação, a placa foi lavada quatro vezes com PBS (200 µL), retirando as células. Em seguida, foi adicionada a solução enzimática conjugada a todos os poços (50 µL), sendo novamente incubada por 60 minutos, a 2° a 8° C. A seguir foram adicionados os substratos colorimétricos e as leituras dos “spots” foram realizadas no leitor automatizado de ELISPOT Axioplan 2 KS ELISPOT (Carl Zeiss Vision – Germany). O teste é considerado positivo se os painéis reagirem, de acordo com os seguintes critérios:

- a) Controle negativo com 0 a 5 “spots”:

Contagem do painel – contagem do controle negativo ≥ 6 .

- b) Controle negativo com mais de 5 “spots”:

Contagem do painel ≥ 2 vezes a contagem do controle negativo.

5.4 Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ por ELISPOT com PPD

Cada poço de uma placa de ELISPOT (Multiscreen – 96 poço filtration plate, 4510, Millipore) foi sensibilizado em ambiente estéril com 4 µg/ml de anti-IFN- γ (M-700A-Endogen) diluído em tampão carbonato-bicarbonato, 100 µL por poço. A placa foi incubada por toda a noite a 4°C, e após esse período, lavada duas vezes com PBS, em ambiente estéril. Em seguida foi adicionado o tampão de bloqueio (PBS + 4% de BSA₂)

em ambiente estéril e a placa incubada a 37° C por 2 horas. A seguir, a placa foi novamente lavada duas vezes com PBS, em ambiente estéril e 2×10^5 PBMC em 100 μ L de RPMI+ SAB (Soro Albumina Bovino) 10% aplicadas em cada poço, em triplicata. Foi então adicionado PPD (5 μ g/ml) e incubada por 18 horas a 37° C. Após este período, o conteúdo da placa foi desprezado e a mesma lavada 10 vezes manualmente, com PBS 0,05% de Tween 20, sendo então adicionado anti-IFN- γ biotilado (M-701B – Endogen), 1 μ g/ml, em tampão PBS-BSA 1% e incubada por duas horas a 37°C. Após este período a placa foi novamente lavada com PBS 0,05% de Tween 20, adicionado 100 μ L/poço de estreptoavidina-fosfatase alcalina (1:6000 em PBS-BSA1%) e incubada a 37° C por uma hora. Após novas lavagens, foi adicionado 50 μ L/ poço da solução substrato (NBT - BCIP), incubando-se a placa no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Desprezado todo líquido contido na placa, a parada de reação foi assegurada com 20 lavagens com H₂O deionizada. As leituras dos “spots” foram realizadas como acima em leitor automatizado. Para este ensaio foram considerados positivos os resultados que apresentaram no mínimo 25 “spots” por milhão de células, subtraídos da produção basal, e o dobro do número de “spots” do basal (Jeffries et al., 2006; Silva, 2010,b).

5.5 Determinação da Produção de IFN- γ em Sobrenadantes de Cultura de PBMC por ELISA

Microplacas de poliestireno com 96 alvéolos (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ (2,5 μ g/mL, Endogen, SA) e incubadas 4°C por toda a noite.

As microplacas foram bloqueadas com tampão fosfato (PBS, pH 7,6) com 4% de soro albumina bovina por duas horas a temperatura ambiente e lavadas com Tris HCl 5 mM, 0,1 % Tween. Os sobrenadantes, curva padrão (10–1000 pg/ml) e anticorpo monoclonal humano Biotinilado anti-IFN- γ (1 μ g/ml, Endogen USA) foram adicionados aos poços e as placas permaneceram duas horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem com Tris HCl 5mM 0,02% Tween foi adicionada streptoavidina-peroxidase (1/20.000 Genzyme) por 15 minutos a 37 °C. A reação foi revelada com tetrametilbenzidina (TMB-Organon Teknika, Netherlands) e a reação enzimática interrompida com ácido sulfúrico 1M. As densidades ópticas foram medidas no leitor de ELISA com filtro 450 nm (leitora Biorad, Hercules, CA) e a concentração determinada por relação densidade óptica x curva padrão (utilizando software GraphPad Prism 3.0). O limite de detecção do teste para as citocinas foi de 10 pg/ml. Após a realização de vários ensaios de ELISA para dosagem de citocinas realizados em nosso laboratório, foi adotado arbitrariamente como “*cut-off*” para o ensaio o valor de 100 pg/ml, ou seja, uma produção superior a 100 pg/ml indica que o indivíduo apresenta resposta positiva ao estímulo utilizado.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foram realizadas as etapas de estatística descritiva para caracterizar os pacientes do estudo em cada momento da observação, podendo ser visualizado através de um gráfico de perfis de respostas. Devido a natureza dos dados, para a realização dos testes de hipóteses para a verificação do efeito do medicamento aos pacientes, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas (Crowder ; Hand,1990; Diggle et al.,1994). Em função ainda do pequeno número amostral, caso não se confirmasse a normalidade dos dados, foi utilizada a análise não paramétrica de dados em desenhos com observações longitudinais (Brunner ; Langer, 2000; Rosa, 2001). As análises dos dados foram realizadas no Laboratório de Estatística Aplicada da FCT/UNESP, com a utilização do Software SAS, Versão 9.1.3.

7 RESULTADOS

7.1 Seleção da casuística e obtenção e armazenamento de células mononucleares dos pacientes durante o tratamento com inibidor de TNF

Dos 15 pacientes incluídos no estudo houve perda de três pacientes, um por intercorrência médica ao iniciar a terapêutica (colecistectomia) e dois por problemas técnicos na separação celular durante a primeira coleta. Dados demográficos dos pacientes estão demonstrados na tabela abaixo. Todos foram tratados com infliximabe de acordo com o protocolo prescrito (Figura 3).

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo

PACIENTES	IDADE	SEXO	RAÇA	PROFISSÃO	DIAGNÓSTICO DA DOENÇA	TT
out 1	70	M	Amarela	Aposentado	3 anos	NÃO REATOR
#1	55	M	Amarela	Escriturário	8 anos	NÃO REATOR
#2	47	M	Parda	Motorista	7 anos	NÃO REATOR
#3	48	M	Branca	Mecânico	8 anos	REATOR 6mm
out 2	20	F	Branca	Estudante	10 anos	NÃO REATOR
#4	34	M	Negra	Secretário	10 anos	NÃO REATOR
#5	63	F	Branca	Aposentada	7 anos	NÃO REATOR
#6	51	M	Branca	Pedreiro	5 anos	NÃO REATOR
out 3	64	F	Amarela	Aposentada	20 anos	NÃO REATOR
#7	61	F	Branca	Aposentada	12 anos	REATOR 20 mm
#8	48	M	Branco	Comerciante	15 anos	NÃO REATOR
#9	61	M	Branca	Aposentado	8 anos	REATOR 20mm
#10	66	F	Branca	Aposentada	13 anos	REATOR 15mm
#11	26	F	Branca	Estudante	10 anos	NÃO REATOR
#12	19	F	Parda	Estudante	4 anos	NÃO REATOR

* out = pacientes excluídos do estudo.

No quadro a seguir estão indicados os tempos de coleta e a evolução clínica medida pelo PASI (Figura 4).

Tabela 4. PASI medido em cada coleta

PACIENTE	1a INF (Semana 0)	PASI	2a INF (Semana 2)	PASI	3a INF (Semana 6)	PASI	2a COLETA (Semana 7)	3a COLETA	4a COLETA	PASI	5a COLETA	PASI
1	27/11/2007	23,5	12/12/2007	14,8	08/01/2008	14,8	16/01/2008	07/02/2008	04/03/2008	10	não	
2	16/04/2007	23,2	30/04/2007	10	28/05/2007	10	04/06/2007	19/07/2007	06/08/2007	0	não	
3	13/08/2007	34	27/08/2007	24	24/09/2007	0	02/10/2007	24/10/2007	20/11/2007	6	não	
4	19/02/2009	24,5	05/03/2009	18	02/04/2009	10	09/04/2009	27/04/2009	25/05/2009	0	não	
5	12/02/2008	34,2	26/02/2008	30,8	25/03/2008	13,6	01/04/2008	23/04/2008	18/05/2008	0	não	
6	25/04/2007	24,1	09/05/2007	NF	06/06/2007	NF	14/06/2007	04/07/2007	09/08/2007	5	24/11/2009	26
7	11/08/2008	20	25/08/2008	16	22/09/2008	14	29/09/2008	24/10/2008	23/11/2008	13,6	16/12/2010	16
8	16/03/2007	22	30/03/2007	10,8	27/04/2007	6	04/05/2007	04/07/2007	10/08/2007	NF	não	NF
9	11/11/2008	25,5	25/11/2008	12	23/12/2008	3	30/12/2008	20/01/2009	18/02/2009	4	07/12/2010	6
10	28/08/2007	30,4	11/09/2007	22	09/10/2007	5	16/10/2007	02/11/2007	05/12/2007	0	27/09/2009	4
11	20/07/2007	15	02/08/2007	10,2	30/08/2007	6	26/09/2007	16/10/2007	14/11/2007	3	02/12/2009	6
12	18/06/2007	23,8	02/07/2007	12	30/07/2007	6	06/08/2007	31/08/2007	01/10/2007	2	não	

Amostras de sangue periférico dos pacientes em tubos heparinizados foram enviadas para o Laboratório de Imunologia LIM-56 permanecendo aproximadamente 16 horas em transporte. À chegada ao laboratório foram imediatamente processadas para isolamento das PBMCs. Estas foram aliquotadas em criotubos, congeladas de acordo com os materiais e métodos, e mantidas em nitrogênio líquido. Pelo menos dois criotubos de cada data da coleta de um mesmo paciente foram descongelados no dia do experimento, de forma que PBMCs de todas as coletas de um mesmo paciente fossem testadas simultaneamente. Foram feitas duas contagens, uma imediatamente após o descongelamento e, uma segunda contagem após 3-4 horas em repouso em meio enriquecido (RPMI 10% SFB). Os resultados de viabilidade estão demonstrados na tabela a seguir (Figura 5). Foram utilizadas as PBMCs que apresentaram viabilidade > 75% pelo corante vital “tripan blue” nas duas contagens.

Tabela 5. Porcentagens de viabilidade das PBMC imediatamente e 3-4 h após o descongelamento, respectivamente

Pacientes	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta		4ª coleta		5ª coleta	
1	89%	87%	87%	85%	Não realizada		95%	87%	90%	92%
2	97%	87%	82%	90%	89%	87%	91%	95%	Não realizada	
3	97%	99%	90%	95%	95%	97%	93%	97%	Não realizada	
4	86%	76%	90%	94%	94%	95%	97%	88%	96%	97%
5	88%	85%	87%	74%	94%	90%	69%	66%	94%	93%
6	>80%	>80%	>80%	>80%	>80%	>80%	>80%	>80%	Não realizada	
7	98%	98%	98%	93%	96%	96%	96%	92%	94%	96%
8	90%	80%	87%	93%	92%	94%	93%	94%	90%	87%
9	85%	80%	87%	85%	96%	93%	94%	98%	96%	95%
10	85%	85%	90%	91%	92%	78%	90%	94%	Não realizada	
11	85%	93%	94%	89%	92%	90%	78%	94%	Não realizada	
12	97%	91%	88%	90%	< 50%		89%	89%	Não realizada	

Os ensaios de ELISPOT para quantificação de células de memória-efetora produtoras de IFN- γ foram realizados nos pacientes que completaram no mínimo quatro coletas, de tal modo que, todos os tempos foram analisados sob as mesmas condições experimentais, em um mesmo momento, em triplicatas. Como critério para o descongelamento de células foi adotado viabilidade >75% por azul de Tripan imediatamente após o descongelamento e, novamente, acima de 75% após 3-4 horas de repouso em meio enriquecido em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Diante da observação de que a maioria dos pacientes (apenas quatro foram reatores) se revelou não reatora ao TT, optou-se pela introdução de novos antígenos para se avaliar o impacto do tratamento na resposta imune. Além de ESAT-6 e CFP-10, constituintes do T-SPOT *TB*, e de PPD e PHA, no ELISPOT estabelecido em nosso laboratório, utilizamos como antígeno o lisado de citomegalovirus (CMV, 5 g/mL), que já se constituía como um dos antígenos do painel de avaliação de imunidade celular do laboratório. O outro antígeno, na verdade um superantígeno, a proteína de choque térmico enterotoxina B de estafilococo (SEB, Sigma #11100-45-1) foi utilizado na concentração de 50 ng/mL. Assim, analisamos a resposta por ELISPOT a antígeno de memória que é reconhecido por 96,4% da população brasileira (CMV) (Souza et al, 2010) e a um superantígeno, importante componente da resposta imune a várias bactérias, micobactérias inclusive, além dos antígenos de *Mtb*.

Naqueles pacientes em que houve disponibilidade de células, foram realizadas culturas de seis dias dos PBMCs na presença dos mesmos antígenos, para obtenção de sobrenadantes de cultura e posterior dosagem de IFN- γ nos mesmos pela técnica de ELISA.

7.2 Correlação do resultado de ELISPOT para IFN- γ com a evolução clínica ao longo do tratamento nos 12 pacientes

São apresentados a seguir os resultados completos de quantificação por ELISPOT das células produtoras de IFN- α ao longo do tratamento com o i-TNF- α dos 12 pacientes do estudo (Figuras 3 a 14).

Figura 3. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #1

Paciente do sexo masculino, 55 anos, com psoríase vulgar há oito anos. Vinha apresentando insucesso ao tratamento com acitretina e MTX. À entrada no estudo, apresentava anamnese, exame físico e radiografia de tórax sem alterações e TT negativo. Iniciou infliximabe em 27/11/2007 com PASI de 23,5. A avaliação imunológica por ELISPOT mostrava boa resposta aos estímulos inespecíficos (PHA e

SEB), porém resposta negativa ao CMV. Em consonância com seu resultado de TT, não apresentou resposta “*in vitro*” aos antígenos de *Mtb*. Na semana 2, apresentou PASI de 14,8, mantendo-se com melhora clínica na semana 6. A avaliação da semana 7 mostrou aumento das respostas imunológicas: exacerbação da resposta a PHA e SEB e a resposta a CMV, antes negativa, passou a ser detectável. A resposta ao *Mtb* continuou indetectável e, assim, se manteve por todo o período de estudo. Na semana 14, retorno para a quarta infusão, já não apresentava lesão cutânea, porém, optou-se por suspender a medicação devido à nova alteração nas enzimas hepáticas, optando-se pela substituição do infliximabe por outro i-TNF- α . Na última avaliação, as resposta a PHA e SEB se mantiveram estáveis, entretanto a resposta ao CMV voltou a negativar.

Figura 4. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #2

Paciente masculino, 47 anos, com psoríase vulgar há sete anos. Apresentou intolerância gástrica ao tratamento com MTX oral e subcutâneo e não obteve melhora clínica após seis meses com acitretina. Anamnese, exame físico e radiografia de tórax sem sinais de Tb, além de TT negativo à entrada no estudo. Iniciado infliximabe com PASI de 23,2, e já nas semanas 2 e 6, este índice caiu para 10; na semana 14 retornou sem lesão. A avaliação imunológica por ELISPOT demonstrava boa resposta aos estímulos inespecíficos (PHA e SEB) e resposta positiva ao CMV, porém, resposta negativa aos antígenos de *Mtb* em consonância com o TT. A resposta ao *Mtb* se manteve indetectável por todo o período de estudo. A avaliação na semana 7 mostrou respostas estáveis aos estímulos inespecíficos e aumento da resposta ao CMV (de oito para 17 *spots*/poço). Na última avaliação, as resposta a PHA e SEB tenderam à queda, assim como a resposta ao CMV; entretanto a resposta a este último persistiu positiva.

Figura 5. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #3

Paciente masculino, 48 anos, com psoríase vulgar há oito anos. Fez tratamento com MTX por muitos anos e acitretina por um ano sem resposta. Em 2007 optamos por iniciar infliximabe. Apresentava na ocasião anamnese e exame físico sem alterações, radiografia de tórax normal e TT positivo (6 mm). Realizada a quimioprofilaxia com isoniazida por seis meses e após um mês do início da profilaxia fizemos a primeira infusão de infliximabe em 13/08/2007, quando apresentava PASI de 34. No ELISPOT visualizamos excelente resposta aos antígenos inespecíficos (SEB e PHA) desde a semana 1 até a última, quadro este que se manteve estável com leve aumento da resposta ao SEB na semana 14. A resposta a CMV foi sempre positiva, tendendo à queda até a semana 10, e na semana 14 houve um pico passando de quatro para 65 spots/poço. Divergindo do TT, a resposta para antígenos específicos do *MTb* foi negativa nas semanas 1, 7 e 10, positivando apenas ESAT e PPD na semana 14. O CFP manteve-se negativo durante todo o período estudado. A resposta clínica foi satisfatória com PASI baixando para 24 na semana 2 e já se apresentou praticamente sem lesões na semana 6.

Figura 6. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #4

Paciente com 34 anos, masculino, apresenta psoríase vulgar há 10 anos, fez tratamento com MTX, ciclosporina e acitretina antes do estudo. Antecedentes pessoais de HAS, todavia apresentava exame físico e radiografia de tórax normais com TT negativo. Iniciamos as infusões de infliximabe em 19/02/2009 e, nesta data, o PASI era de 24,5. O ELISPOT foi negativo para antígenos do *Mtb* durante todo o tratamento. A resposta a estímulos inespecíficos aumentou na semana 7, porém, retornou a níveis próximos dos iniciais na semana 14. Houve melhora da resposta ao CMV, passando de seis para 20 spots/poço na semana 7, todavia retornando aos níveis iniciais na semana 14. Este paciente manteve-se em tratamento com a medicação e na semana 25, mostrou novamente um aumento da resposta ao CMV. Clinicamente o PASI na semana 2 caiu para 18 e para 10 na 3ª, passando para cinco na semana 14. Este paciente apresentou recidiva das lesões mantendo PASI de 26 na semana 25, quando associamos MTX ao tratamento.

Figura 7. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #5

Paciente de 63 anos, sexo feminino, relatava psoríase vulgar há sete anos. Usou acitretina por dois anos e MTX por três anos com resposta parcial. Apresentava HAS de difícil controle.

No início do tratamento a medida do PASI foi de 34,2, com restante do exame físico normal. Radiografia de tórax sem alterações e TT negativo. Iniciamos as infusões em 12/02/2008, onde apresentava ao ELISPOT resposta satisfatória ao PHA, CMV e SEB, com ausência de resposta ao CFP, ESAT e PPD. Na semana 6 sua medida do PASI foi de 13,6, apresentando na semana 7 as mesmas características da semana 1 e na semana 10 houve positividade próxima ao “cut-off” com CFP (de 0 para 5,5 *spots/poço*). Na semana 14 todas as respostas caíram significativamente. No dia 16/12/2008, na semana 25 o PASI era de 16 sendo que as respostas inespecíficas e também ao CMV voltaram aos níveis pré-tratamento.

Figura 8. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #6

Paciente de 51 anos, sexo masculino, com psoríase vulgar há cinco anos. Usou como terapêuticas anteriores o MTX sem resposta e a acitretina por três meses com elevação acentuada do nível de triglicérides, tendo que suspender a droga. Na consulta inicial apresentou anamnese e exame físico sem alterações, radiografia de tórax normal e TT negativo. Iniciamos o infliximabe em 25/04/2007, quando apresentava PASI de 24,1. Em relação à resposta imunológica mostrou na semana 1 negatividade aos antígenos específicos do *Mtb*, elevada resposta aos antígenos inespecíficos e resposta positiva ao CMV.

Nas semanas 7 e 10 houve persistência da não resposta em relação à ESAT, CFP e PPD, contudo as respostas a CMV, SEB e PHA tiveram um ligeiro aumento que se manteve até a semana 14.

Figura 9. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #7

Paciente de 61 anos, sexo feminino, com psoríase vulgar há 12 anos. Fez tratamento com MTX por muitos anos e acitretina com resposta parcial, porém, com elevação dos triglicérides. Fez tratamento com ciclosporina com aumento considerável da pressão arterial. Ao exame físico não apresentou alterações significativas, radiografia de tórax dentro do padrão da normalidade e TT positivo (20 mm), após pesquisa para Tb extrapulmonar, foi feito diagnóstico de Tb latente e tratada com rifampicina por 3 meses.

A primeira infusão de infliximabe foi realizada em 11/08/2008. Apresentava no dia PASI de 20. O resultado do ELISPOT na semana 0 mostrou resposta satisfatória para estímulos inespecíficos, baixa resposta ao CMV e ausência de resposta aos antígenos específicos do *Mtb*.

Na semana 7 um dos antígenos específicos para *Mtb* se positivou (PPD). Na semana 10 houve diminuição na resposta aos antígenos inespecíficos (SEB e PHA) e do PPD.

O PHA retornou ao nível inicial na semana 14, mas, o SEB permaneceu com tendência a diminuição da resposta. Na semana 25 o que nos chama a atenção é uma queda da resposta imunológica ao CMV, chegando a se negativar, mostrando assim a importância da medicação na manutenção do equilíbrio imunológico do doente.

Figura 10. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #8

Paciente do sexo masculino, 48 anos, comerciante, relatava psoríase vulgar há 15 anos. Fez tratamento anterior com acitretina por cinco anos e MTX por três anos, porém, com piora progressiva das lesões. Aos exames era não reator ao TT e sua radiografia de tórax não mostrou alterações. Apresentava HAS e negava outras doenças associadas ao quadro. Iniciou as infusões em 10/03/2007, com PASI de 22 e no ELISPOT mostrava resposta a PHA e SEB elevadas, sendo a resposta ao CMV e antígenos específicos de *Mtb* negativos.

Nas semanas 2 e 6 a melhora clínica era visível, com o PASI diminuindo progressivamente para 10,8 e 6. Dia 04/05/2007, na semana 7, as respostas em relação ao PHA e aos antígenos do *Mtb* não se alteraram, entretanto, houve um aumento de resposta para os antígenos SEB e CMV. Na semana 10, enquanto a resposta ao SEB e PHA permaneceram estáveis, o CMV voltou a negativar. Na semana 25 os parâmetros

para todas as respostas voltaram muitos próximos dos resultados iniciais, permanecendo com melhora clínica e mantendo PASI 4.

Figura 11. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #9

Paciente de 61 anos, sexo masculino, aposentado, queixava-se de psoríase vulgar há oito anos. Usou como terapêutica sistêmica inicial o MTX por um ano e posteriormente acitretina por dois anos com recidiva das lesões. Apresentava HAS de difícil controle. A medida do TT foi de 20 mm e a radiografia de tórax normal. Optou-se por iniciar isoniazida para profilaxia de Tb latente após descartada Tb pulmonar e extrapulmonar, sendo administrada do mês 12/2006 a 06/2007 e após o término do tratamento foi liberado pelo infectologista para início do infliximabe. Recebeu a primeira infusão no dia 11/11/2008, devido à dificuldade em conseguir a droga pelo Sistema Único de Saúde, nesta data apresentava PASI de 25,5. A segunda infusão foi realizada no dia 25/11/2008, com o PASI já diminuindo para 12 e posteriormente para três. Apresentava como resultado do ELISPOT na semana 0, potente resposta imunológica a PHA somente,

apresentando fraca resposta a SEB (14 *spots*/poço) e a CMV. Resposta a antígenos específicos de *Mtb* eram negativas. Na semana 7 as respostas a todos os antígenos foi aumentada, inclusive com positividade dos antígenos específicos do *Mtb*. Houve manutenção nos níveis de resposta contra os antígenos inespecíficos na semana 10, com ligeira queda quando utilizados os antígenos específicos, porém, todos ainda mantiveram níveis de positividade. Na semana 14 a resposta ao PHA manteve-se estável e as outras continuaram em leve declínio. A semana 25 mostrou como resultado os níveis de INF contra o PHA e CMV mantidos em relação à coleta anterior e contra o SEB, ESAT, PPD e CFP com discreto aumento da resposta, nesta data o paciente apresenta quadro clínico com melhora acentuada (PASI 6).

Figura 12. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #10

Paciente do sexo feminino, aposentada, 66 anos, relatava psoríase há 13 anos. Usou dapsona por quatro anos, MTX por três anos, sendo contraindicados a acitretina e a ciclosporina devido a HAS, DM e hipertrigliceridemia associada à insuficiência

coronariana. Reatora ao TT, foram descartados sinais de insuficiência cardíaca ou de Tb a radiografia de tórax e exames para Tb extrapulmonar sem alterações.

Iniciou isoniazida em 03/2006 e realizou a primeira infusão do infliximabe no dia 28/08/2007, quando apresentava PASI de 30,4. Na semana 2 (11/09/2007) retornou com PASI 22.

Na semana 0 a resposta ao ELISPOT mostrou-se satisfatória aos estímulos inespecíficos e baixa ao CMV, sendo apenas um dos antígenos específicos para *Mtb* positivos (CFP), o ESAT e PPD não apresentavam resposta. Na semana 7 houve aumento da resposta imunológica em relação a todos os antígenos testados, entretanto ainda sem respostas positivas com ESAT e PPD (5 *spots*/poço). Na semana 10 houve diminuição dos níveis de INF contra PHA, SEB e CMV e ausência de resposta aos antígenos específicos do *Mtb*. Na semana 14, a paciente apresentava melhora clínica (PASI 2), e o ELISPOT colhido neste dia mostrou novo aumento dos níveis de INF contra os antígenos inespecíficos, CMV e CFP, porém, as respostas a ESAT e PPD permaneceram sempre negativas.

Figura 13. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #11

Paciente do sexo feminino, 26 anos, estudante. Apresentava psoríase vulgar há 10 anos. Fez tratamento com MTX por quatro anos, não usou a acitretina devido à idade fértil. Negava antecedentes pessoais ou familiares que contraindicassem o uso do infliximabe. Na primeira aplicação (20/07/2007) apresentava PASI 15 que passou para 10,2 na segunda infusão.

Na semana 0 o ELISPOT mostrou resposta a PHA, SEB e CMV e ausência de resposta contra os antígenos específicos do *Mtb*. Na semana 7, a resposta aos estímulos inespecíficos manteve-se inalterada e ao CMV houve queda de 88,5 para 23,5, mantendo entretanto resposta francamente positiva. Na semana 10 houve apenas ligeiro aumento para aos estímulos inespecíficos e na semana 14 estes resultados permaneceram estáveis; com exceção do aparecimento de resposta marginalmente positiva ao PPD (5,5 *spots*/poço). Na data da última coleta apresentava PASI 6.

Figura 14. Resultado dos ensaios ELISPOT no paciente #12

Paciente do sexo feminino, 19 anos, estudante. Apresenta psoríase vulgar há 13 anos com piora no último ano. Usou MTX por cinco anos e ciclosporina por seis meses. Foi indicado o tratamento com infliximabe após apresentar ideias suicidas. Apresentava anamnese e exame físico sem alterações, não reatora ao TT e com radiografia de tórax normal. A primeira infusão o PASI era de 23,8.

Na semana 0 o ELISPOT identificou resposta aos estímulos inespecíficos e CMV, sendo que, para os antígenos do *Mtb* não houve resposta *in vitro* em nenhum dos momentos testados. Após a fase de indução, na semana 6 apresentava melhora clínica satisfatória com PASI 6 e na coleta da semana 7 houve ligeira queda da resposta imunológica ao CMV que se recuperou na semana 14. Na semana 10 apresentou baixa viabilidade das células pós-descongelamento (Tabela 5) impedindo a realização do ensaio. O ELISPOT da semana 14 manteve os mesmos padrões da primeira coleta.

7.3 Análise da resposta de INF- α ao longo do tratamento por ELISPOT e ELISA do grupo de pacientes estudado:

Com a finalidade de se avaliar a variação da resposta imune (medida por ELISPOT [Figuras 15 e 16] e ELISA [Figura 17]) do grupo de pacientes antes e durante o tratamento com infliximabe, os resultados foram representados em mediana e percentis 25 e 75% para cada tempo de coleta. A figura 15 ilustra os resultados do ELISPOT sem estímulo (a) e utilizando-se os estímulos inespecíficos PHA (b) e SEB (c) e com antígeno de CMV (d).

Figura 15. (a,b,c,d) - Resultado dos ensaios ELISPOT ao longo do tratamento realizado sem estímulo, e, usando como antígenos a PHA, o SEB e o CMV

Figura 16. (a,b,c) – Resultados positivos do ELISPOT realizado com antígenos específicos para Tb (CFP-10, ESAT-6 e PPD)

Pode-se observar que, no pico do efeito do infliximabe, uma semana após a 3ª dose (semana 7), há significativo aumento do número de spots em resposta aos dois primeiros estímulos, e nítida tendência ao aumento da resposta ao CMV, apesar de não ter alcançado significância estatística. Observa-se também que há tendência à queda, ainda que variável, quando se analisam as respostas nas 10 e 14ª semanas, no momento do nadir do efeito do i-TNF- α (imediatamente antes da aplicação da próxima dose da medicação), tendendo aos níveis pré-tratamento. Da mesma forma, a figura 16 mostra grande aumento da resposta aos antígenos de *Mtb* nos dois indivíduos PPD+ na 7ª semana (#9 e #10). É nítida também a queda destas respostas na 10 e 14ª semanas. Observa-se, entretanto que um paciente (#3) apresenta resposta positiva ao PPD e ao ESAT-6 na 14ª semana (paciente este que era reator fraco ao TT).

Figura 17. (a,b,c,d) – Resultados com o método ELISA ao longo do tratamento realizado com os antígenos PHA, SEB, CMV e no último gráfico mostrando apenas os casos com positividade ao antígeno PPD

Em relação ao ELISA (Figs. 17) realizado com estímulos não relacionados ao *Mtb*, não houve aumento ou diminuição significativos da resposta de INF- γ secretada no sobrenadante do 5º dia de cultura. Observamos apenas elevação discreta com SEB na 7ª semana, que tendeu a baixar posteriormente, nas 10 e 14ª semanas. Observou-se, da mesma forma, leve aumento da resposta ao CMV nas semanas 7 e 10ª, que também retornou aos níveis basais na 14ª semana.

Nos sobrenadantes de culturas realizadas com estímulo de PPD, a figura mostra positividade da resposta nos pacientes #9 e #10 desde a 1ª coleta, que aumentaram de maneira expressiva, passando de ~100 e ~300 pcg/ml para mais de 2000 e 3000 pcg/ml, respectivamente, na 7 e 10ª semanas. Na 14ª semana o paciente #10 volta aos níveis anteriores ao tratamento, apresentando resposta negativa, e o paciente #9 mantém altos níveis até a 14ª semana, da mesma forma que o observado com ELISPOT. Surpreendentemente houve positividade do paciente #4, não reator ao TT, que se manteve até a 10ª semana, voltando aos níveis anteriores na 14ª semana. O ELISA não teve resultado positivo para o paciente #3, como ocorreu com o ELISPOT.

Os resultados acima mostram, por dois métodos distintos de quantificar a produção de INF- γ que, tanto com o ELISA como com o ELISPOT, não houve diminuição da resposta de INF- γ nos pacientes durante o tratamento com infliximabe, ocorrendo inclusive em algumas circunstâncias aumento significativo desta resposta.

8 DISCUSSÃO

O TNF- α é uma das citocinas envolvidas na patogênese da psoríase e, também, no desenvolvimento e manutenção do granuloma em várias doenças infecciosas (Salgado; Gómez-Reino, 2011). Sabe-se, inclusive, que as drogas i-TNF- α tornam o organismo mais suscetível ao desenvolvimento de infecções causadas por patógenos intracelulares, tais como a tuberculose, a coccidioidomicose, a listeriose e a histoplasmose (Hamdi et al., 2006; Saliu et al., 2006; Marino et al., 2007; Wallis, 2009). Em relação às classes de i-TNF- α , quando comparado ao etanercept, o infliximabe foi associado a um risco entre duas a sete vezes maior de desenvolvimento de tais doenças, dentro de um período curto de tempo após a introdução da droga e com casos de doenças mais graves, como Tb disseminada e extrapulmonar (Wallis et al., 2004; Saliu et al., 2006). Apesar de tais afirmativas os pacientes deste estudo mostraram, em sua maioria, a manutenção da resposta imunológica após a fase de indução do infliximabe, não apresentando alterações significativas na resposta das células T aos diversos estímulos pesquisados.

Dos 12 pacientes que concluíram o estudo, sete tiveram uma melhora da resposta aos antígenos inespecíficos, SEB ou CMV no ELISPOT após o início da medicação. Nenhum deles apresentou queda significativa da resposta imunológica no período estudado.

Neste estudo utilizamos dois métodos de avaliação da resposta imune celular, o ELISA, que faz análise da produção de INF- γ e o ELISPOT, que quantifica as células produtoras de INF- γ . A técnica ELISA avalia a resposta das células T de memória central, células que necessitam de vários dias após a ativação para que ocorra

expansão clonal e liberação de quantidade substancial de citocinas (Geginat et al., 2002; Hoft et al., 2002; Silva et al., 2010b); já o ELISPOT avalia preferencialmente células T de memória efetora, ou seja, aquelas que não necessitam das etapas necessárias a células “naives” para realizar seus objetivos, elas já estão diferenciadas e aptas a exercer resposta efetora rápida após o contato com o antígeno (Lalvani et al., 2001; Geginat et al., 2002; Silva et al., 2010b). Os resultados obtidos com o ELISA e o ELISPOT demonstram, de forma geral, que não há perda da resposta de subpopulação de células T memória-efetora e central produtoras de IFN- γ .

Da mesma forma, no tocante ao ELISA em todas as amostras colhidas, não houve queda da resposta a nenhum antígeno pesquisado, mostrando uma resposta imunológica estável durante todo o período estudado. Interessante, também, foi o aumento significativo dos níveis de IFN- γ quando realizado o exame com o antígeno PPD, níveis que subiram já na 7^a semana e diminuíram quando a dose do infliximabe caiu (logo antes da próxima aplicação).

Mesmo em se tratando de uma pequena casuística, estes dados parecem ser relevantes, pois, contrastam com o que a maior parte da literatura referente às doenças inflamatórias imunomediadas (DIIM), como artrite reumatoide (AR), doença de Crohn (DC), espondilite anquilosante (EA), entre outras, mostram (Agnolt et al., 2003; Zouet al., 2003; Schotte et al., 2004; Shen et al., 2005; Vigna-Pérez, 2005), ou seja, uma diminuição da resposta nos ensaios realizados. Há, entretanto, poucos dados em pacientes com psoríase (Silva et al., 2010b), sendo o presente estudo o primeiro neste molde em pacientes com psoríase em país onde a incidência da Tb é alta. Estudos de células de pacientes com DIIM demonstraram diminuição da resposta proliferativa e da produção de citocinas, especialmente INF- γ , induzida “*in vitro*” por diferentes

estímulos mitogênicos ou antigênicos, ocasionalmente de micobactérias (PPD p. ex.) na presença dos i-TNF- α . Agnolt et al. (2003), demonstraram diminuição da produção de INF- γ e GM-CSF por células T de pacientes com DC utilizando ELISA. Shen et al. (2005) mostraram diminuição da produção de IL-10 e IL-12 em monócitos de pacientes com DC em tratamento com adalimumabe e infliximabe. Da mesma forma Saliu et al. (2006), apresentaram dados compatíveis com a diminuição da produção de INF- γ e IL-10 induzida por PPD em indivíduos saudáveis com os i-TNF- α , utilizando ELISA. Estudos “*in vitro*” mostram um efeito diferencial dos inibidores conforme o ensaio imunológico utilizado. Em pacientes com psoríase moderada a grave, a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ mediada por ELISA nos sobrenadantes de culturas de PBMC estimulados com antígenos de micobactérias diminuíram pelo infliximabe usado “*in vitro*”; a quantificação de células T memória-efetora produtoras de IFN- γ por ELISPOT permaneceu inalterada (Silva et al., 2010b). Trabalhos com pacientes sob terapêutica com os i-TNF- α demonstram diminuição da resposta imune (Zou et al., 2003; Schotte et al., 2004; Vigna-Pérez, 2005), e, especialmente, o estudo de Hamdi et al. (2006), que utilizou casuística expressiva mostrando diminuição “*in vivo*” e “*in vitro*” nos resultados de ELISPOT utilizando como estímulo o PPD após 14 semanas de tratamento com drogas i-TNF- α nos diferentes grupos estudados. Estes autores postulam ainda que o ELISPOT deve ser feito antes da introdução da droga, devido a intensa supressão que o antagonista provocou na produção de IFN- γ , e, que essa diminuição, pode auxiliar na reativação da Tb, associada a uma apoptose de linfócitos T CD4 ativados expressando TNF- α .

Entretanto, há alguns estudos “*in vitro*” demonstrando resultados similares aos descritos nesta casuística, onde se observa aumento da resposta de citocinas,

especialmente em pacientes com EA, cuja imunodesregulação parece diferir das outras DIIM (Baeten et al., 2001; Zou et al., 2003b), corroborando o resultado deste estudo no tocante ao ELISPOT dos pacientes #1, #2, #4, #6, #8, #9 e #10. Nos pacientes #3, #5, #7, #11 e #12 observa-se a manutenção da produção das citocinas, como no estudo de Appel et al. (2007), realizado igualmente com pacientes apresentando EA em tratamento com infliximabe ou adalimumabe, utilizando-se a citometria de fluxo.

Nos pacientes com AR em uso de infliximabe, estudo de Popa et al. (2005), demonstrou, através do ELISA, que a produção de IFN- γ estava muito diminuída previamente ao tratamento, e que a terapêutica com o infliximabe, não modificou estes baixos níveis. Os resultados apresentados no atual trabalho se assemelham mais aos de Berg et al. (2001), que observaram recuperação dos níveis de citocinas pós-tratamento, medidos por ELISA em sobrenadantes de cultura de PBMC estimulados com diferentes antígenos, incluindo PPD.

Neste estudo, os quatro pacientes reatores ao TT (#3, #7, #9 e #10) não apresentaram resposta aos antígenos específicos para Tb no ELISPOT da primeira coleta realizada (antes da introdução do infliximabe), havendo positividade apenas após o início do tratamento. Estes resultados, apesar do pequeno número de pacientes, sugerem uma melhora da atividade dos linfócitos T em relação à produção do IFN- γ após a introdução da droga, o que contrasta com a já bem estabelecida importância da citocina INF- γ no desencadeamento da resposta imune celular efetora. Com o uso da medicação i-TNF- α , ocorreria uma diminuição na produção do INF- γ , inclusive com possíveis reativações dos focos quiescentes do *Mtb*, e, maior suscetibilidade a infecções. Todavia, este estudo sugere que esta linha de raciocínio não é a única envolvida no mecanismo de reativação de bactérias intracelulares, ocorrendo, provavelmente, associação com outras vias

imunológicas e citocinas para a manutenção da resposta celular imunomediada. Provavelmente, haja também uma imunossupressão causada pela doença que, após o controle da produção exagerada do TNF- α através do uso do infliximabe, se restabelece. Sendo assim, o TNF- α é regulado com a utilização da droga.

Já se sabe que pacientes com psoríase mostram resposta celular reduzida a antígenos brutos de diferentes micobactérias (Bay et al., 1998) e que apresentam maior incidência de linfomas, provavelmente devido a ativação crônica do sistema imunológico, evidenciada na pele através do eritema, das placas e da descamação (Gelfand et al., 2003). Isto poderia levar a uma diminuição do repertório de células funcionais disponíveis para a resposta imune a antígenos de memória (Tavani et al., 2000; Margolis et al., 2001; Gelfand et al., 2003; Gelfand et al., 2006). Em uma avaliação realizada sobre o efeito da inibição do TNF- α na resposta imune a antígenos micobacterianos, verificou-se que os pacientes com psoríase grave apresentaram uma baixa reatividade “*in vitro*”, principalmente das respostas que avaliam linfócitos T de memória central, aos antígenos de *Mtb* (Silva et al., 2012). Existe uma hipótese que na doença grave haja maior mobilização de linfócitos que reconhecem antígenos relacionados à psoríase para a pele, ocorrendo uma diminuição da resposta imunológica sistêmica aos demais antígenos, sendo que, algumas citocinas cuja expressão seria restrita a linfonodos e tecidos linfoides, estão presentes na pele lesionada em alta concentração (Krueger; Bowcock, 2005). Acredita-se, ainda, que o estresse e o déficit na qualidade de vida dos pacientes com doença grave, possam diminuir a efetividade da resposta imunológica (Lima, 2010). Sendo assim, com a introdução do infliximabe, ocorreria uma remodelação do sistema imunológico, com diminuição do TNF- α em excesso e regulação das citocinas no restante da cadeia

imunológica, melhorando a qualidade das respostas dos pacientes a antígenos, assim como vemos clinicamente a melhora das lesões e da qualidade de vida. É importante salientar-se que o TNF- α não é aumentado, mas sim, regulado com o uso da droga.

Não foi a intenção deste estudo concluir tal afirmação, apenas, estimular e incitar a continuidade de trabalhos com maiores amostras e por período de tempo mais prolongado. Acredita-se que, da mesma maneira com que a inflamação crônica da doença grave causa a placa de psoríase na pele e todo o quadro sistêmico, podendo acometer vasos e causar doenças metabólicas associadas à psoríase, e quando bloqueamos a doença pelo uso da droga i-TNF- α , esse quadro pode ser evitado, assim também exista a modulação de todo sistema imunológico, resultando em equilíbrio e melhoria da resposta imune do indivíduo. Lembramos que, todos os pacientes do estudo mantiveram-se sem tratamento sistêmico por no mínimo três meses antes da coleta das amostras, ou seja, não houve a interferência de imunossupressores no resultado obtido.

O presente trabalho vem a acrescentar neste sentido, pois é o primeiro mostrando a ausência de queda da resposta em uso do infliximabe em psoríase. Outros estudos mostraram que a produção de INF- γ não foi alterada (continuou baixa), porém, os indivíduos pesquisados tinham outras doenças inflamatórias imunomediadas e estavam em uso de imunossupressores não imunobiológicos, como o MTX, em associação com o infliximabe (Sellan et al., 2007; Kwakernaak et al., 2011).

A partir destes estudos verifica-se que a literatura mostra-se controversa, e ainda não está totalmente claro por qual mecanismo as drogas i-TNF- α resultam em maior risco de reativação de Tb. Um estudo de Bruns e colaboradores (2009), propõe como mecanismo a deficiência transiente de células T CD8 memória-efetora com atividade citotóxica anti-micobacteria.

É possível que as alterações imunológicas secundárias ao uso do infliximabe sejam reguladas de forma individualizada, havendo pacientes com diminuição da resposta das células T, com maior suscetibilidade ao desenvolvimento de infecções e, em outros indivíduos, pode existir uma regulação do sistema imunológico, com melhora da resposta e maior produção de INF- γ pelos linfócitos T. Temos a favor deste postulado a evidência de que se esperava uma maior quantidade de infecções nos pacientes em uso de drogas i-TNF- α e o que se verifica atualmente é apenas um aumento deste número, quando comparado a outras terapêuticas utilizadas. Para exemplificar, a incidência de Tb em pacientes tratados com infliximabe na Inglaterra e na Suécia é de 1.5 por 1.000 pacientes e na Coreia houve dois casos diagnosticados em 90 pacientes (Tubach et al, 2009). No Brasil, um total de 6.037 pacientes com DIIM usaram infliximabe no Estado de São Paulo no ano de 2009 e o índice da Tb nestes pacientes foi de 279.9/100.000, sendo 7.4 vezes maior que o índice da população do local na mesma data (37.9/100.000) (Silva et al., 2012), o que não se altera muito quando comparado a outros países nos quais a endemicidade para Tb é baixa, como na França, entre 2004 a 2006, onde o índice de Tb em pacientes com DIIM usando infliximabe foi de 187.5/100.000 pessoas por ano e a população saudável do país apresentou índice de 9/100.000 pessoas ao ano (Carmona et al, 2005). Salientamos que a monitorização da função das células T através de exames que quantifiquem a produção de INF- γ a determinados antígenos durante o tratamento com os i-TNF- α pode ser um identificador de pacientes mais suscetíveis ao desenvolvimento da Tb ou outras doenças associadas.

9 CONCLUSÃO

No atual estudo, a maioria dos pacientes tratados com infliximabe para psoríase moderada a grave não mostrou, na avaliação da produção de INF- γ pelos linfócitos realizada com o exame ELISPOT para antígenos específicos e inespecíficos, alteração importante na função das células T. Pelo contrário, alguns pacientes apresentaram melhora da resposta de INF- γ , sugerido que o bloqueio do TNF pode contribuir para diminuir a desregulação imunológica de alguns pacientes.

10 REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
2. Agnholt J, Dahlerup JF, Kaltoft K. The effect of etanercept and infliximab on the production of tumour necrosis factor- α , interferon- γ and GM-CSF in *in vivo* activated intestinal T lymphocyte cultures. *Cytokine* 2003;23(3):76-85.
3. ATS (American Thoracic Society). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Resp Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1):1376-95.
4. ATS/CDCP (American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 2):S221-47.
5. Appel H, Scheer R, Haibel H, Wu P, Spiller I, Brandt H, Song IH, Rudwaleit M, Thiel A, Sieper J. *In Vitro* observations of T cell responsiveness to recall antigens during tumor necrosis factor- α -blocking therapy in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2007;34(11):2264-70.
6. Arend SM, Engelhard ACF, Groot G, Boer K, Adersen P, Ottenhoff THM, van Dissel JT. Tuberculin skin testing compared with T-Cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(6):1089-96.

7. Azfar RS, Gelfand JM. Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(4):416-22.
8. Baetenen D, van Damme N, Van Den Bosch F, Kruithof E, De Vos M, Mielants H, Veys EM, De Keyser F. Impaired Th 1 cytokine production in spondyloarthropathy is restored by anti-TNF alpha. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(8):750-5.
9. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by Mycobacterium- reactive human T-cell clones. *Infect Immun*. 1993;61(1):197-203.
10. Bay ML, Lehrer A, Bressanelli A, Morini J, Bottasso O, Stanford J. Psoriasis patients have T-cells with reduced responsiveness to common Mycobacterial antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998;21(1):65-70.
11. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996;334(26):1717-25.
12. Berg L, Lampa J, Rogberg S, van Vollenhoven R, Klareskog L. Increased peripheral T cell reactivity to microbial antigens and collagen type II in rheumatoid arthritis after treatment with soluble TNF alpha receptors. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(2):133-9.
13. Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today*. 1999;20(1):40-6.
14. Brunner E, Langer F. Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. *Biom J*. 2000;42(6):663-75.

-
15. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Harter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Invest*. 2009;119(5):1167-77.
 16. Calabrese LH. Molecular differences in anticytokine therapies. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21(2):241-8.
 17. Callen JP, Krueger GG, Lebwohl M, Mcburney EI, Mease P, Menter A, Paller AS, Pariser DM, Weinblatt M, Zimmerman G. AAD consensus statement on psoriasis therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(5):897-9.
 18. Carmona L, Gomez-Reino JJ, Rodriguez-Valverde V, Montero D, Pascual-Gómez E, Mola EM, Carreño L, Figueroa M; BIOBADASER Group. Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum*. 2005;52(6):1766-72.
 19. Catrina AI, Trollmo C, Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermansson Y, Klareskog L, Ulfgren AK. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1):61-72.
 20. Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63(2):736-40.
 21. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomized trial. *Lancet*. 2001;357(9271):1842-47.

-
22. Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis . In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Company; 1999. p. 495-521.
 23. Collamer AN, Guerrero KT, Henning JS, Battafarano DF. Psoriatic skin lesions induced by tumor necrosis factor antagonist therapy: a literature review and potential mechanisms of action. *Arthritis Rheum*. 2008;59(7):996-1001.
 24. Consenso Brasileiro de Psoríase - 2012. Guias de Avaliação e Tratamento - Sociedade Brasileira de Dermatologia. 2^a ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2009. 172p.
 25. Crowder MJ, Hand DJ. *Analysis of repeated measures*. New York: Chapman and Hall; 1990.
 26. Das RP, Jain Ak, Ramesh V. Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Indian J Dermatol*. 2009;54(1):7-12.
 27. DATASUS – Departamento de Informática do SUS. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br>. (Acessado em 23/02/2012).
 28. De Andrade Lima E, De Andrade Lima M, De Lorena VM, De Miranda Gomes Y, Lupi O, Benard G. Evaluation of an IFN-gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis in patients with psoriasis in a highly endemic setting. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(6):694-7.
 29. De Rie MA, Goedkoop AY, Bos JD. Overview of psoriasis. *Dermatol Therapy*. 2004;17(5):341-9.

-
30. Dheda K, Pooran A, Pai M, Miller Rf, Lesley K, Booth Hl, Scott Gm, Akbar An, Zumla A, Rook GA. Interpretation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific IFN γ release assays (T-SPOT.TB) and factors that may modulate test results. *J Infect.* 2007;55(2):169-73.
 31. Diggle PJ, Liang KY, Zeger SL. *Analysis of longitudinal data*. New York: Oxford University Press; 1994.
 32. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cinque B, Millimaggi D, Morera R, Ricevuti L, Cifone MG, Corazza GR. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut.* 2004;53(1):70-7.
 33. Duffin KC, Chandran V, Gladman DD, Krueger GG, Elder JT, Rahman P. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: update and future direction. *J Rheumatol.* 2008;35(7):1449-53.
 34. Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol.* 1994;130(2):216-24.
 35. Farber EM, Nall L. Epidemiology: natural history and genetics. In: Roenigk HH, Maibach HI, editors. *Psoriasis*. 3th ed. New York: Marcel Dekker; 1998. p.107-57.
 36. Farber EM, Nall L. The natural history of 5600 patients. *Dermatologica.* 1974;148(1):1-18.
 37. Finlay AY, Khan GK, Luscombe DK, Salek MS. Validation of sickness impact profile and psoriasis disability index in psoriasis. *Br J Dermatol.* 1990;123(6):751-6.

-
38. Finlay AY, Khan GK. Dermatology life quality index (DLQI) – a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol*. 1994;19(3):210-6.
39. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2(6):561-72.
40. Garcia I, Miyazaki Y, Marchal G, Lesslauer W, Vassalli P. High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and INF-gamma in the differentiation of protective granulomas. *Eur J Immunol*. 1997;27(12):3182-90.
41. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, Vinh DC. Anti-tumor necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(3):148-55.
42. Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(3 Suppl 2):S67-80.
43. Geginat J, Campagnaro S, Sallusto F, Lanzavecchia A. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines. *Adv Exp Med Biol*. 2002;512:107-12.
44. Gelfand JM, Shin DB, Neimann AL, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. The risk of lymphoma in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2006;126(10):2194-201.

-
45. Gelfand JM, Berlin J, Van Voorhees A, Margolis DJ. Lymphoma rates are low but increased in patients with psoriasis: results from a population-based cohort study in the United Kingdom. *Arch Dermatol*. 2003;139(11):1425-9.
 46. Gelfand JM, Weinstein R, Porter SB, Neimann AI, Berlin JA, Margolis DJ. Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch Dermatol*. 2005;141(12):1537-41.
 47. Gisondi P, Girolomoni G. Psoriasis and atherothrombotic diseases: disease-specific and non-disease-specific risk factors. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35(3):313-24.
 48. Goedkoop AY, Kraan MC, Teunissen MB, Picavet DI, De Rie MA, Bos JD, Tak PP. Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(7):769-73.
 49. Gomez-Reino JJ, Carmona L, Angel Descalzo M; BIOBADASER GROUP. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum*. 2007;57(5):756-61.
 50. Gordon KB, Papp KA, Hamilton TK, Walicke PA, Dummer W, Li N, Bresnahan BW, Menter A; Efalizumab study group. Efalizumab for patients with moderate to severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290(23):3073-80.
 51. Gordon KB, Ruderman EM. The treatment of psoriatic and psoriatic arthritis: An interdisciplinary approach. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(3 Suppl 2):S85-91.

-
52. Gottlieb AB, Evans R, Li S, Dooley LT, Guzzo CA, Baker D, Bala M, Marano CW, Menter A. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(4):534-42.
 53. Gottlieb AB, Masud S, Ramamurthi R, Abdulghani A, Romano P, Chaudhari U, Dooley LT, Fasanmade AA, Wagner CL. Pharmacodynamic and pharmacokinetic response to anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody (infliximab) treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48(1):68-75.
 54. Granstein RD. New treatments for psoriasis. *N Engl J Med*. 2001;345(4):284-7.
 55. Green AC. Australian aborigines and psoriasis. *Australas J Dermatol*. 1984;25(1):18-24.
 56. Guenther L, Langley RG, Shear NH, Bissonnette R, Ho V, Lynde C, Murray E, Papp K, Poulin Y, Zip C. Integrating biologic agents into management of moderate-to-severe psoriasis: a consensus of the Canadian psoriasis expert panel. *J Cutan Med Surg*. 2004;8(5):321-37.
 57. Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol*. 2003;149(3):530-4.H
 58. Hamdi H, Mariette X, Godot V, Weldingh K, Hamid AM, Prejean MV, Baron G, Lemann M, Puechal X, Breban M, Berenbaum F, Delchier JC, Flipo RM, Dautzenberg B, Salmon D, Humbert M, Emilie D; RATIO (Recherche sur Anti-TNF et Infections Opportunistes) Study Group. Inhibition of anti-tuberculosis T-lymphocyte function with tumour necrosis factor antagonists. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R114.

-
59. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1997;159(2):635-43.
60. Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(6):982-6.
61. Hernandez C, Cetner AS, Jordan JE, Puangsuvan SN, Robinson JK. Tuberculosis in the age of biologic therapy. *J Am Dermatol*. 2008;59(3):363-80.
62. Hoft DF, Worku S, Kampmann B, Whalen CC, Ellner JJ, Hirsch CS, Brown RB, Larkin R, Li Q, Yun H, Silver RF. Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of mycobacterial growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. *J Infect Dis*. 2002;186(10):1448-57.
63. Holick MF, Smith E, Pincus S. Skin as the site of vitamin D synthesis and target tissue for 1,25-dihydroxyvitamin D 3. Use of calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for treatment of psoriasis. *Arch Dermatol*. 1987;123(12):1677-83.
64. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993;17(6):968-75.
65. Huerta C, Rivero E, Rodrigues LA. Incidence and risk factors for psoriasis in the general population. *Arch Dermatol*. 2007;143(12):1559-65.
66. Jeffries DJ, Hill PC, Lugos M, Jackson-Sillah DJ, Adegbola RA, Brookes RH. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for diagnoses of *Mycobacterium tuberculosis* infection in Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(2):192-8.

-
67. Jordan CT, Cao L, Roberson ED, Duan S, Helms CA, Nair RP, Duffin KC, Stuart PE, Goldgar D, Hayashi G, Olfson EH, Feng BJ, Pullinger CR, Kane JP, Wise CA, Goldbach-Mansky R, Lowea MA, Peddle L, Chandran V, Liao W, Rahman P, Krueger GG, Gladman D, Elder JT, Menter A, Bowcock AM. Rare and common variants in CARD14, encoding and epidermal regulator of NF-KappaB, in psoriasis. *Am J Hum Genet.* 2012;90(5):796-808.
68. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, Cho B, Han Sk, Shim YS, Yim JJ. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005;293(22):2756-61.
69. Kaplan MJ. Cardiometabolic risk in psoriasis: differential effects of biologic agents. *Vasc Heath Risk Manag.* 2008;4(6):1229-35.
70. Kim JY, Lim JE, Jung JY, Son JY, Lee KJ, Yoon YW, Park BH, Moon JW, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kang YA. Performance of the tuberculin skin test and interferon-gamma release assay for detection of tuberculosis infection in immunocompromised patients in a BCG-vaccinated population. *BMC Infect Dis.* 2009;9:207.
71. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol.* 1993;30(16):1443-53.
72. Krueger GG, Callis KP. Development and use of alefacept to treat psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(Suppl 2):S87-97.
73. Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(Suppl 2):ii30-6.

-
74. Kwakernaak AJ, Houtman PM, Weel JF, Spoorenberg JP, Jansen TL. A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor alfa inhibitor. *Clin Rheumatol*. 2011;30(4):505-10.
75. Ladel CH, Szalay YG, Riedel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* – infected macrophages. *Infect Immun*. 1997;65(5):1936-8.
76. Laffitte E, Janssens JP, Roux-Lombard P, Thielen AM, Barde C, Marazza G, Panizzon RG, Saurat JH. Tuberculosis screening in patients with psoriasis before antitumour necrosis factor therapy: compararison of an interferon-gamma release assay vs. tuberculin skin test. *Br J Dermatol*. 2009;161(4):797-800.
77. Lalvani A, Nagvenkar P, Udhwadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, Ewer K, Hill AV, Mehta A, Rodrigues C. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis*. 2001;183(3):469-77.
78. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schroder JM, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449(7162):564-9.
79. Langley RG, Ellis CN. Evaluating psoriasis with Psoriasis Area and Severity Index. Psoriasis Global Assessment, and Lattice System Physician's Global Assessment. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(4):563-9.

-
80. Lee SS, Chou KJ, Dou HY, Huang TS, Ni YY, Fang HC, Tsai HC, Sy CI, Chen JK, Wu KS, Wang YH, Lin HH, Chen YS. High Prevalence of latent tuberculosis infection in dialysis patients using the Interferon-gamma release assay and tuberculin skin test. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(8):1451-7.
81. Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet*. 2003;361(9364):1197-204.
82. Lima EVA. *Avaliação do teste T-SPOT.TB no diagnóstico de infecção tuberculosa latente em pacientes com psoríase* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.
83. Listing J, Strangfeld A, Kary S, Rau R, Von Hinueber U, Stoyanova-Scholz M, Gromnica-Ihle E, Antoni C, Herzer P, Kekow J, Schneider M, Zink A. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3403-12.
84. Li YY, Zollner TM, Schon MP. Targeting leukocyte recruitment in the treatment of psoriasis. *Clin Dermatol*. 2008;26(5):527-38.
85. Lomholt G. Prevalence of skin diseases in a population; a census study from the Faroe islands. *Dan Med Bull*. 1964;11:1-7.
86. Long R, Gardam M. Tumor necrosis factor-alpha inhibitors and the reactivation of latent tuberculosis infection. *CMAJ*. 2003;168(9):1153-6.
87. Lopes DM, Pinheiro VG, Monteiro HS, Queiroz JA, Madeira L dos S, Lopes MM. Diagnosis and treatment of latent tuberculosis in patients with chronic inflammatory diseases: use of TNF-alpha-targeting biological products. *J Bras Pneumol*. 2011;37(3):308-16.

-
88. Luger A, Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*. 2001;121(5):1145-57.
89. Lui H, Mamelak AJ. Psoriasis, plaque. 2007. Emedicine (on-line) [cited 2011 jan]. Available from:<http://www.emedicine.com/derm/topic365.htm>.
90. Maini RN, Elliott M, Brennan FM, Williams RO, Feldmann M. TNF blockade in rheumatoid arthritis: implications for therapy and pathogenesis. *APMIS*. 1997;105(4):257-63.
91. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human th-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008;9(6):641-9.
92. Margolis D, Bilker W, Hennessy S, Vittorio C, Santanna J, Strom BL. The risk of malignancy associated with psoriasis. *Arch Dermatol*. 2001;137(6):778-83.
93. Marino S, Sud D, Plessner H, Lin PL, Chan J, Flynn JL, Kirschner DE. Differences in reactivation of Tuberculosis induced from anti-TNF treatments are based on bioavailability in granulomatous tissue. *PLoS Comput Biol*. 2007;3(10):1909-24.
94. Martins GA, Arruda L, Mugnaini ASB. Validação de questionários de avaliação da qualidade de vida em pacientes de psoríase. *An Bras Dermatol*. 2004;79(5):521-35.

-
95. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, Vanderstoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomized trial. *Lancet*. 2000;356(9227):385-90.
96. Mease PJ, Menter MA. Quality-of-life issues in psoriasis and psoriatic arthritis: Outcome measures and therapies from a dermatological perspective. *J Am Dermatol*. 2006;54(4):685-704.
97. Mehlis S, Gordon KB. From laboratory to clinic: rationale for biologic therapy. *Dermatol Clin*. 2004;22(4):371-7.
98. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). *Tuberculose: Guia de Vigilância epidemiológica*. Elaborado pelo comitê Técnico-Científico de assessoramento à Tuberculose e Comitê assessor para co-infecção HIV-Tuberculose e colaboradores - Brasília (DF); 2002.
99. Moreland LW, Heck LW Jr, Kopman WJ. Biologic agents for treating rheumatoid arthritis: concepts and progress. *Arthritis Rheum*. 1997;40(3):397-409.
100. Mrowietz U, Elder JT, Barker J. The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*. 2007;298(7):309-16.
101. Orme IM, Miller ES, Robert AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, Chi D, Rivoire B, Brennan PJ. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol*. 1992;148(1):189-96.

-
102. Pai M, Gokhale K, Joshi R, Dogra S, Kalantri S, Mendiratta DK, Narang P, Daley CL, Granich RM, Mazurek GH, Reingold AL, Riley LW, Colford JM Jr. Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA*. 2005;293(22):2746-55.
103. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6(3):413-22.
104. Pai M, Menzies D. The new IGRA and the old TST: making good use of disagreement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(6):529-31.
105. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systemic review. T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008;149(3):177-84.
106. Pearce DJ, Morrison AE, Higgins KB, Crane MM, Balkrishnan R, Fleischer AB. The comorbid state of psoriasis patients in a University Dermatology practice. *J Dermatolog Treat*. 2005;16(5-6):319-323.
107. Piller RVB. Epidemiologia da Tuberculose. *Pulmão (Rio J)*. 2012;21(1):4-9.
108. Ponce de León 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 derivate in patients with rheumatoid arthritis: study in a population with high prevalence of tuberculosis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(9):1360-1.

-
109. Popa C, Netea MG, Barrera P, Radstake TR, Van Riel PL, Kullberg BJ, Van der Meer JW. Cytokine production of stimulated whole blood cultures in rheumatoid arthritis patients receiving short-term infliximab therapy. *Cytokine*. 2005;30(2):72-7.
110. Portal Programa Nacional de Controle da Tuberculose – PNCT. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527. Tuberculose. (Acessado em 03/05/2013).
111. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrner C, Pfenninger D, Lewis E, Chakrabarti A, Richardson BC, Sheldon E, McCune WJ, Kaplan MJ. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood*. 2004;103(10):3677-83.
112. Rahman P, Elder JT. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(Suppl 2):ii37-9.
113. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB Jr, Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41(3 Pt 1):401-7.
114. Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15(1):16-7.
115. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):917-28.
116. Rodrigues AP, Teixeira RM. Desvendando a Psoríase. *RBAC Rev Bras Análises Clin*. 2009;41(4):303-9.

-
117. Romiti N. História da psoríase. In: Romiti R. Compêndio de psoríase. 2nd. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. Cap 2, p. 7-10.
118. Romiti R, Maragno L, Arnone M, Takahashi MD. Psoriasis in childhood and adolescence. *An Bras Dermatol*. 2009;84(1):9-20.
119. Rosa P. *Análise não-paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo; 2001.
120. Saliu O, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: Differential effects on Mycobacterial immunity. *J Infect Dis*. 2006;194(4):486-92.
121. Sampaio SAP, Rivitti EA. Erupções eritemato-escamosas. In: *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas; 1998. Cap.17, p.170-9.
122. Salgado E, Gomez – Reino JJ. The risk of Tuberculosis in patients treated with TNF antagonists. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;7(3):329-40.
123. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Bindings and functional comparisons of two types of tumor necrosis antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(2):418-26.
124. Schmitt-Egenolf M, Eirmann TH, Boehncke WH, Stander M, Sterry W. Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303:a population- and family-based study. *J Invest Dermatol*. 1996;106(4):711-4.

-
125. Schotte H, Schluter B, Willeke P, Mickholz E, Schorat MA, Domschke W, Gaubitz M. Long-term treatment with etanercept significantly reduces the number of proinflammatory cytokine-secreting peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004;43(8):960-4.
126. Scholvinck E, Wilkinson KA, Whelan AO, Martineau AR, Levin M, Wilkinson RJ. Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: Comparison between whole-blood and enzyme-Linked immunospot methods. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):829-931.
127. Sebbag M, Parry SL, Brennan FM, Feldmann M. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 1997;27(3):624-32.
128. Sellam J, Hamdi H, Roy C, Baron G, Lemann M, Puéchal X, Breban M, Berenbaum F, Humbert M, Weldingh K, Salmon D, Ravaud P, Emilie D, Mariette X. Comparison of in vitro-specific blood tests with tuberculin skin test for diagnosis of latent tuberculosis before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1610-5.
129. Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8+ T cells primed for production of Type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun*. 1999;67(8):3980-8.
130. Shams H, Wizel B, Weis SE, Samtem B, Barbnes PF. Contribution of CD8+ T Cells to gamma interferon production in human tuberculosis. *Infect Immun*. 2001;69(5):3497-501.

-
131. Shealy DJ, Visvanathan S. Anti- TNF antibodies: lessons from the past, roadmap for the future. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(181):101-29.
 132. Shen C, Assche GV, Colpaert S, Maerten P, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21(3):251-8.
 133. Silva LC, Geluk A, Arnone M, Romiti R, Franken KC, Duarte AJ, Takahashi MD, Benard G. Infliximab partially impairs the anti-Micobacterium tuberculosis immune responses of severe psoriasis patients with positive tuberculin skin-test. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(3):319-24.
 134. Silva LC, Ortigosa LC, Benard G. Anti-TNF- α agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: mechanisms of action and pitfalls. *Immunotherapy*. 2010;2(6):817-33.
 135. Silva LC, Silveira GG, Arnone M, Romiti R, Geluk A, Franken KC, Duarte AJ, Takahashi MD, Benard G. Decrease in Mycobacterium tuberculosis specific immune responses in patients with untreated psoriasis living in a tuberculosis endemic area. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(4):255-62.
 136. Sivamani RK, Goodarzi H, Garcia MS, Raychaudhuri SP, Wehrli LN, Ono Y, Maverakis E. Biologic therapies in the treatment of psoriasis: A comprehensive evidence-based basic science and clinical review and a practical guide to Tuberculosis monitoring. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(2):121-40.
 137. Smith CH, Anstey AV, Barker JN, Burden AD, Chalmers RJ, Chandler D, Finlay AY, Griffiths CE, Jackson K, Mchugh NJ, Mckenna KE, Reynolds NJ, Ormerod AD, British Association of Dermatologists. British Association of Dermatologists guidelines for use of biological interventions in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2005;153(3):486-97.

138. Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, Kampmann B, Hellmich B, Groves R, Schreiber S, Wallis RS, Sotgiu G, Scholinck EH, Goletti D, Zellweger IP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P, Bossink A, Duarte R, Erkens C, Clark J, Migliori GB, Lange C. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1185-206.
139. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):359-61.
140. Sterry W, Barker J, Boehncke WH, Bos JD, Chimenti S, Christophers E, De La Brassinne M, Ferrandiz C, Griffiths C, Katsambas A, Kragballe K, Lynde C, Menter A, Ortonne JP, Papp K, Prinz J, Rzany B, Ronnevig J, Saurat JH, Stahle M, Stengel FM, Van De Kerkhof P, Voorhees J. Biological therapies in the systemic management of psoriasis: International Consensus Conference. *Br J Dermatol*. 2004;151(S69):3-17.
141. Tanji MM. *Resposta immune celular a diferentes antígenos micobacterianos em indivíduos infectados por Mycobacterium tuberculosis: avaliação por ELISPOT, ELISA e linfoproliferação* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.
142. Tavani A, La Vecchia C, Franceschi S, Serraino D, Carbone A. Medical history and risk of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Cancer Prev*. 2000;9(1):59-64.
143. Tonel G, Conrad C. Interplay between keratinocytes and immune cells – recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(5):963-8.

-
144. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):244-79.
 145. Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Breban M, Pallot-Prades B, Poulin S, Sacchi A, Chichemanian RM, Bretagni S, Emilie D, Lemmann M, Lortholary O, Mariette X. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1884-94.
 146. Tutuncu Z, Kavanaugh A. Rheumatic disease in the elderly: Rheumatoid arthritis. *Clin Geriatr Med.* 2005;21(3):513-25.
 147. Van den Brande JM, Braat H, Van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, Van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJ. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T- lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2003;124(7):1774-85.
 148. Van de Kerkhof P, Schalkwijk J. Psoriasis. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. New York: Mosby; 2008. Chap 9, p. 115-35.
 149. Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol.* 2002;1(3):264-75.
 150. Victor FC, Gottlieb AB, Menter A. Changing paradigms in dermatology: tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) blockade in psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Dermatol.* 2003;21(5):392-7.

151. Vigna-Pérez M, Abud-Mendoza C, Portillo-Salazar H, Alvarado-Sánchez B, Cuervas-Horta E, Moreno-Valdés R, Baranda L, Paredes- Saharopulos O, González-Amaro R. Immune effects of therapy with Adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):372-80.
152. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H) 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007;445(7128):648-51.
153. Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J. Down-regulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in Ankylosing Spondylitis during treatment with infliximab. *Arthritis Rheum*. 2003;48(3):780-90.
154. Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J. Up regulation of the production of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(6):561-4.
155. Waite JC, Skokos D. TH17 response and inflammatory autoimmune disease. *Int J Inflam*. 2012;2012:819467.
156. Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis*. 2004;38(9):1261-5.
157. Wallis RS. Infectious complications of tumor necrosis factor blockade. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22(4):403-9.

158. Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:787-819.
159. Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, Kunz S, Docke WD, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. The Th-17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2009;39(12):3570-81.
160. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control 2010. [cited 2011 mar 1]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
161. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009. [cited 2011 mar 1]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html