Léia Cristina Rodrigues da Silva

**Avaliação do efeito do bloqueio de Fator de Necrose Tumoral alfa
(TNF-a) na resposta imune *in vitro* aos antígenos de
Mycobacterium tuberculosis em pacientes com psoríase**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

**São Paulo
2008**

CONFIA

Deus criou a noite
para que todas as criaturas
tomem conhecimento
do futuro brilhante que
as espera, nas alegrias do
Infinito Amor, em Seu Imenso
Império de Estrelas.

Francisco Cândido Xavier, ditado pelo Espírito Emmanuel

DEDICO ESTE TRABALHO

AOS MEUS MAIORES AFETOS:

MINHA MÃE TEREZA E MEU ESPOSO CARLOS

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade inestimável de aprendizado e aperfeiçoamento.

Aos pacientes que voluntariamente participaram deste estudo, e sem os quais a realização do mesmo seria impossível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gil Benard pela excelente orientação, e ao Gil pela convivência engrandecedora, pela paciência e pela confiança em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte por abrir as portas do LIM-56 permitindo a realização deste estudo.

Ao Dr. Maury Massani Tanji, meu querido professor, cujos ensinamentos tornaram possível à realização dos testes imunológicos deste estudo.

A minha colega Soraya Ogusuku que sempre me auxiliou em minhas dúvidas e dificuldades.

Ao meu colega Guilherme Gomes Silveira pela colaboração na execução de parte dos ensaios e pela visão otimista frente às adversidades.

Aos colegas Anna C. Collanieri e ao Cyro A. de Brito pela colaboração na revisão da minha dissertação, e pela valiosa troca de conhecimentos.

Aos meus queridos colegas que aceitaram participar deste estudo como controles:
Ângelo, Adriana de Brito, Adriana Jesus, Adriana Rocha, Dr. Alexandre Almeida,
Cyro, Chang, Dr. Dewton, Erica, Fernando, Heide, Dr. Jorge Casseb, Marta, Mayce,
Nelson, Noemia Orie, Silvia, Tânia, Vilma e Viviane.

A Dra. Denise Takahashi por ter permitido a realização da coleta das amostras dos
pacientes no Ambulatório de Psoríase.

Aos Drs. Marcelo Arnone e Ricardo Romiti pela colaboração na triagem dos
pacientes.

A todos os colaboradores do LIM56 pelo auxílio ao longo do desenvolvimento deste
estudo.

MUITO OBRIGADA!

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO

1.1.1 – Psoríase.....	1
1.1.2 – Epidemiologia.....	1
1.1.3 - Imunopatogênese da psoríase.....	2
1.1.4 – Tratamento.....	4
1.1.5 - Infliximab e etanercepte.....	4
1.1.6 – Efeito do tratamento com biológicos.....	6
1.2 – Tuberculose.....	7
1.2.1 – Métodos para avaliação da infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).....	9
1.2.2 – Antígenos empregados na avaliação <i>in vitro</i> da infecção latente por Mtb....	11
1.3 – Diretrizes para aplicação do tratamento com inibidores de TNF- α	13
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVO.....	15
4. CASUÍSTICA.....	16
4.1 Pacientes e controles.....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Antígenos e mitógeno.....	18

5.2 Separação de Células Mononucleares.....	19
5.3 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico para Ensaio de Linfoproliferação.....	19
5.4 Determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-10 em Sobrenadantes de Cultura de PBMC por ELISA.....	21
5.5 Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ por ELISPOT	22
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Avaliação da resposta imune inespecífica dos pacientes.....	25
7.2 Avaliação da resposta imune <i>in vitro</i> aos antígenos micobacterianos dos pacientes com psoríase grave.....	25
7.3 Avaliação da influência do grau de gravidade da psoríase na resposta imune aos antígenos micobacterianos.....	29
7.4 Avaliação da inibição de TNF- α na resposta imune aos antígenos micobacterianos.....	34
8. DISCUSSÃO.....	49
9. CONCLUSÃO.....	59
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CFS	Células formadoras de spots
Ag85B	Antígeno recombinante 85B
BSA ₁	“Body Surface Area”
BSA ₂	“Bovine Serum Albumin”
BCIP/NBT	“5-Bromo-4-chloro-3-indoxil-phosphate”
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	“EnzymeLinked ImmunoSPOT Assay”
ESAT-6	“Early Secreted Antigenic Target-6”
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
I.E.	Índice de estimulação
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Célula Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PHA	Fitohemaglutinina
PPD	“Purified Protein Derivative”
RD1	“Region of Differences1”
TB	Tuberculose
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
UVA	Raios ultravioleta A
UVB	Raios ultravioleta B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desencadeamento do processo inflamatório na psoríase.....	3
Figura 2. Inibidores de TNF- α	6
Figura 3. Resposta linfoproliferativa medida por incorporação de timidina tritiada frente aos estímulos: (A) AgSMtb (antígeno bruto sonicado da cepa H37Rv); (B) Ag85B (proteína recombinante 85B); (C) ESAT-6 (early secreted antigenic target 6).....	27
Figura 4. Dosagem da secreção de IFN- γ frente aos estímulos: (A) AgSMtb (antígeno bruto sonicado da cepa H37Rv); (B) Ag85B (proteína recombinante 85B); (C) ESAT-6 (early secreted protein target-6).....	28
Figura 5. Resposta linfoproliferativa frente aos estímulos: (A) AgSMtb; (B) Ag85B; (C) ESAT-6	31
Figura 6. Dosagem da secreção de IFN- γ frente aos estímulos: (A) AgSMtb; (B) Ag85B; (C) ESAT-6.....	33
Figura 7. Avaliação da ação dos inibidores de TNF- α na secreção de TNF- α frente ao estímulo PHA em pacientes com psoríase grave.....	35

Figura 8. Resposta linfoproliferativa frente aos antígenos do Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos sadios PPD (+).....	37
Figura 9. Dosagem da produção de IFN- γ por ELISA frente aos antígenos do Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos sadios PPD (+).....	38
Figura 10. Dosagem da produção de IL-10 por ELISA frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos sadios PPD (+).....	39
Figura 11. Dosagem da produção de TNF- α por ELISA frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos sadios PPD (+).....	40
Figura 12. Quantificação de células produtoras de IFN- γ por ELISPOT dos indivíduos sadios PPD (+).....	41
Figura 13. Resposta linfoproliferativa do grupo dos pacientes PPD (+) frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α	42
Figura 14. Comparação da produção de IFN- γ por ELISA do grupo de pacientes PPD (+) frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α	44
Figura 15. Comparação da produção de IL-10 por ELISA frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos pacientes PPD (+).....	45

Figura 16. Comparação da produção de TNF- α por ELISA frente aos antígenos do Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos pacientes PPD (+)..... 47

Figura 17. Quantificação de células produtoras de IFN- γ por ELISPOT dos pacientes PPD (+)..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos controles e pacientes.....	18
Tabela 2. Quantificação por ELISPOT de células secretoras de IFN- γ (CFS/milhão) em resposta a antígenos de Mtb em pacientes psoríase grave reatores ou não a intradermoreação com PPD.....	29
Tabela 3. Medianas (percentis 25 – 75%) da resposta linfoproliferativa (I.E.) e secreção de IFN- γ (pg/ml) frente à estimulação com PHA.....	30
Tabela 4. Medianas (percentis 25-75%) da resposta linfoproliferativa dos controles PPD (+) na presença dos inibidores de TNF- α infliximab e etanercepte	36
Tabela 5. Medianas da produção de TNF- α nos controles PPD (+) na presença dos inibidores de TNF- α infliximab e etanercepte.....	40
Tabela 6. Medianas (percentis 25 – 75%) da produção de TNF- α nos pacientes PPD (+) na presença dos inibidores de TNF- α infliximab e etanercepte.....	46

Silva LCR. Avaliação do efeito do bloqueio de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) na resposta imune *in vitro* aos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com psoríase. [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008.

O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) possui um importante papel na imunopatogênese da psoríase e agentes biológicos, como os inibidores de TNF- α , têm apresentado bons resultados no tratamento desta. No entanto, estes agentes foram associados ao aumento de casos de reativação de tuberculose entre os pacientes que os utilizaram. Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar a resposta imune de pacientes com psoríase grave, ativa, sem tratamento, frente a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), e o efeito dos inibidores de TNF- α nesta resposta. Estudamos 24 pacientes com psoríase grave divididos em 2 grupos: não reatores ($n = 14$) e reatores ($n = 10$) ao teste intradérmico com PPD. Como controle, utilizamos um total de 26 indivíduos saudáveis, também separados em 2 grupos segundo a reatividade ao PPD (PPD-, $n = 13$; PPD+, $n = 13$). Em uma segunda etapa estudamos 11 pacientes com psoríase leve a moderada, também sem tratamento, PPD (-) para avaliarmos a importância da gravidade da psoríase na resposta aos antígenos micobacterianos. Avaliamos a resposta imunológica *in vitro* através da linfoproliferação, quantificação da produção de IFN- γ (ELISA) e quantificação de células produtoras de IFN- γ (ELISPOT), na presença e ausência dos inibidores de TNF- α (infliximab e etanercepte), utilizando os antígenos purificados ESAT-6, Ag85B e o antígeno bruto sonicado da cepa H37Rv (AgSMtb), e o mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Os pacientes com psoríase grave PPD (-) apresentaram resposta linfoproliferativa e níveis de IFN- γ menores que nos controles PPD (-). Os pacientes com psoríase leve a moderada apresentaram resposta imune intermediária entre controles e pacientes graves. Em relação aos inibidores de TNF- α , verificou-se que infliximab e etanercepte apresentaram diferença em suas capacidades de inibição, sendo que somente o infliximab ocasionou a inibição total de TNF- α . Em contrapartida o etanercepte manteve a produção de TNF- α , e em alguns casos elevou sua produção. Estes diminuíram apenas parcialmente a reatividade *in vitro* dos pacientes com psoríase, uma vez que a secreção de IFN- γ e o número de células produtoras de IFN- γ não foram alterados na presença dos inibidores. A secreção de IL-10 foi diminuída tanto na presença do infliximab, quanto na presença do etanercepte. Os dados obtidos permitem concluir que (a) os pacientes com psoríase grave PPD (-) apresentam uma baixa reatividade *in vitro*, principalmente das respostas que avaliam linfócitos T de memória central, aos antígenos de Mtb, sendo que essa baixa reatividade não está totalmente relacionada com a gravidade da doença, uma vez que os pacientes com psoríase leve a moderada apresentaram resposta intermediária a dos controles e pacientes com psoríase grave; (b) e que apesar dos inibidores de TNF- α promoverem uma inibição parcial da resposta imune, a reativação da tuberculose estaria mais relacionada à própria ausência de TNF- α , não compensada pela atuação isolada, e provavelmente insuficiente, de IFN- γ na manutenção do granuloma, do que a outras substanciais modificações na resposta imunológica frente aos antígenos micobacterianos.

Descritores: 1- Psoríase; 2- Fator de Necrose Tumoral-alfa/antagonistas&inibidores;
3- Tuberculose; 4- *Mycobacterium tuberculosis*/ imunologia

Silva LCR. Evaluation of the effect of TNF- α inhibitors in the *in vitro* immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with psoriasis [dissertation]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2008.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) has a pivotal role in psoriasis pathogenesis and biologic agents, such as TNF- α inhibitors, have provided good results in its treatment. However, the use of these agents has been associated with an increase in the number of cases of tuberculosis reactivation. This study aimed to evaluate the immune response of severe psoriasis patients, with active, untreated disease to relevant *Mycobacterium tuberculosis* antigens, and the effect of the TNF- α inhibitors (infliximab and etanercept) in this response. Twenty four severe psoriasis patients were enrolled and divided in two groups according to their reactivity to the tuberculin skin test: TST – (n= 14) and TST + (n=10). As controls, we studied 26 healthy donors, also divided in two groups to the TST reactivity (TST –, n=13; TST+, n=13). Eleven mild to moderate psoriasis patients, untreated, TST (–) were studied to evaluate the role of psoriasis severity in the immune response to the mycobacterial antigens. Immune responses were evaluated *in vitro* by the lymphocyte proliferative response (LPR) assay, ELISA for IFN- γ secretion by peripheral blood mononuclear cells and enumeration of IFN- γ secreted cells (ELISPOT) induced in response to the purified antigens ESAT-6, Ag85B and a crude sonicated antigen preparation from H37Rv Mtb strain (AgSMtb), as well as to the mitogen phytohemagglutinin (PHA), in the presence or absence infliximab/etanercept. The LPR and IFN- γ secretion to Mtb antigens were lower in TST- severe psoriasis patients than TST- controls. Mild to moderate psoriasis patients had intermediate responses, between controls and severe psoriasis patients. The TNF- α inhibitors infliximab and etanercept showed differences in their inhibitory activity, since only infliximab was capable to neutralize all TNF- α . On the other hand, etanercept kept TNF- α production, and in some cases even increased its production. The TNF- α inhibitors diminished partially the *in vitro* patients' immune responses, since the IFN- γ secretion and enumeration of IFN- γ secreted cells were not affected. IL-10 secretion was diminished with both TNF- α inhibitors. In conclusion: (a) TST(–) severe psoriasis patients have decreased *in vitro* reactivity, mainly in those responses that evaluate central memory T-cell responses, to Mtb antigens, and this decrease could not be fully explained by disease severity, since mild psoriasis patients had intermediate responses; (b) and despite the fact that TNF- α inhibitors promote a partial immune response inhibition, tuberculosis reactivation could be related more with the lack of TNF- α , which was probably not compensated by the IFN- γ activity alone, probably insufficient, to the support granuloma formation, than other defects of the immune response to Mtb antigens.

Descriptors: 1- Psoriasis; 2- Tumor necrosis factor-alpha/antagonists&inhibitors; 3- Tuberculosis; 4- *Mycobacterium tuberculosis*/ immunology

1. INTRODUÇÃO

1.1.1 - Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imuno-mediada, que afeta a pele, unhas, mucosas e articulações (Krueger & Bowcock, 2005). Caracteriza-se pela inflamação e hiperplasia de queratinócitos, e que se manifesta como placas eritematosas espessas cobertas por escamas, de tamanhos variados, distribuídas por toda a pele (Lebwohl, 2003). A forma em placas é a forma mais comum, ocorrendo em aproximadamente 80% - 90% dos indivíduos com psoríase (Callen et al., 2003).

A classificação da psoríase é baseada na gravidade da doença e descrita como leve, moderada ou grave. Diferentes índices são utilizados para determinar a gravidade da psoríase, dentre eles: Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Body Surface Area (BSA), Overall Lesion Severity Scale (OLS), Physician's Global Assessment (PGA) e Health Related Quality of Life (HRQL) [Guenther et al., 2004]. Agências regulatórias e indústrias farmacêuticas geralmente definem a gravidade da psoríase através da porcentagem da área corpórea acometida (BSA_1) pelas lesões (Krueger et al., 2000). A National Psoriasis Foundation define como psoríase grave quando o BSA_1 é $> 10\%$, moderada quando o BSA_1 é de $2\%-10\%$ e leve quando o BSA_1 é $< 2\%$ (National Psoriasis Foundation, 2008).

1.1.2 - Epidemiologia

A psoríase é igualmente comum em homens e mulheres, sendo que as primeiras lesões podem aparecer entre os 16 e 22 anos (precose) ou entre os 57 e 60 anos (tardia) [Whittam & McGibbon, 1998; Henseler & Christophers, 1985]. Aproximadamente 2% da população mundial têm psoríase, com a variação da

prevalência estimada entre 0,5% a 4,6%, essa variação dependente da região, sendo mais freqüente em regiões com altas altitudes do que com baixas, e da etnia, acometendo mais caucasianos do que afros descendentes ou asiáticos (Lebwohl, 2003).

1.1.3 - Imunopatogênese da psoríase

Na epiderme e derme das lesões psoriáticas são encontrados linfócitos T ativados, macrófagos, neutrófilos e citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o qual desempenha um importante papel na patogênese da psoríase (Christophers & Mrowietz, 1999; Victor & Gottlieb, 2002).

Na psoríase, a exata fonte de TNF- α é indeterminada. Ele pode ser produzido por uma combinação de diferentes células presentes nas lesões, incluindo queratinócitos, células dendríticas, células T, neutrófilos, monócitos/macrófagos e células Natural Killer (NK) (Victor et al., 2003).

O processo inflamatório pode ser mediado diretamente pelo TNF- α ou através da estimulação da expressão de IL-1. A expressão proeminente de outras citocinas, tais como: IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, interferon-gama (IFN- γ) e fator transformador de crescimento- β (TGF- β) são induzidas e reguladas pelo TNF- α (Bazzoni & Beutler, 1996). Foi relatado que IL-1 e IL-6 atuam como mitógenos sobre os queratinócitos. A expressão aumentada de IL-12 e IL-18, citocinas que atuam em sinergismo, amplifica a resposta imune adquirida tipo Th1, uma vez que estimula a diferenciação dos linfócitos T auxiliares CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ (Schottelius et al., 2004). Há também a participação do TNF- α na indução da expressão aumentada de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas), evento crucial na gênese

do processo inflamatório da derme psoriática por promover o influxo de leucócitos para o sítio inflamatório (Victor et al., 2003) [figura 1].

Figura 1. Desencadeamento do processo inflamatório na psoríase. O desenvolvimento e manutenção das placas evidenciadas na psoríase são devidos a linfócitos T (CD4, CD8, natural killer T [NKT e duplo negativo e/ou CD4NKT-cell]), células dendríticas apresentadoras como as células de Langerhans, células dendríticas plasmocitóides ou mielóides. Essas DCs são responsáveis pela ativação dos linfócitos T infiltrantes, pela interação célula-célula, ocorrendo a sinapse imunológica essencial para o reconhecimento do antígeno. Muitas moléculas acessórias estão envolvidas na sinapse imunológica (p.ex. LFA-1 [lymphocyte function-associated antigen-1], CTLA-4 [cytotoxic T-lymphocyte antigen-4]) as quais são alvos da terapia biológica, demonstrando sua importância biológica no desencadeamento da psoríase. Células T-regulatórias com atividade supressora presentes nas lesões e no sangue dos pacientes são deficientes, o que permite a proliferação contínua dos linfócitos, e a produção crônica de quimiocinas e citocinas do tipo TH1 como IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Terapias que visam à inibição de TNF- α por agentes biológicos como etanercepte, infliximab e adalimumab têm mostrado papel importante como mediador da inflamação na psoríase. A elevada produção dessas citocinas e fatores de crescimento levam a uma hiperplasia dos queratinócitos, com desenvolvimento e diferenciação anormais, os que os tornam resistentes a apoptose. A hiperplasia da epiderme é mantida pela neoangiogênese, a qual é mantida pelas citocinas inflamatórias produzidas pelos linfócitos T. Adaptado de: Gaspari, 2006.

1.1.4 – Tratamento

Os tratamentos mais comumente utilizados para a psoríase são hidratantes, análogos da vitamina D, retinóides, terapia com ultravioleta (UVA e UVB) e, em casos mais graves, ciclosporina e metotrexato (Lebwohl & Ali, 2001; Lebwohl & Ali, 2001a). Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão máximo regulador da produção e comercialização de produtos e serviços relacionados à saúde no Brasil, aprovou o uso de uma nova classe de imunossuppressores, os inibidores de TNF- α , em pacientes com doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide, artrite psoriática e psoríase extensa ou grave. O medicamento mais conhecido e, provavelmente, mais eficaz atualmente é o infliximab (Remicade®, Horsham, PA, USA). Existem, ainda, outros dois inibidores de TNF atualmente aprovados para uso e disponíveis no mercado: o adalimumab (Humira®, Abbott Park, ILL, USA) e o etanercepte (Enbrel®, Thousands Oaks, CA, USA) [Tzu, 2008].

1.1.5 - Infliximab e etanercepte

O infliximab (figura 2) é um anticorpo monoclonal quimérico, humano-murino, com a região constante (Fc) humana e a região variável (Fv) de camundongo que apresenta alta especificidade, afinidade e avidéz pelo TNF- α , tanto em sua forma solúvel como transmembrana, mas não à linfotoxina alfa (TNF- β ou LT- α) [Feldmann, 2002; Knight et al., 1993].

O etanercepte (figura 2) é uma proteína de fusão do receptor p75 do fator de necrose tumoral humano com o fragmento Fc, produzida por tecnologia de DNA recombinante em um sistema mamífero de expressão em células de ovário de hamster chinês. Trata-se de um dímero de uma proteína quimérica, obtido por engenharia genética pela fusão do domínio de ligação extracelular do receptor 2 do fator de necrose tumoral humano (TNFR2/p75) com o domínio Fc da IgG1 humana. Este componente Fc contém as regiões CH₂ e CH₃, mas não possui a região CH₁ da IgG1. O etanercepte inibe a ligação do TNF- α e do TNF- β aos receptores na superfície celular, tornando o TNF biológico inativo e impedindo as respostas celulares mediadas por ele (Feldmann, 2002; Wong et al., 2007).

Figura 2. Inibidores de TNF- α . **a) Anticorpos monoclonais.** Infliximab é um anticorpo quimérico — ele possui a região constante (Fc) humana e a porção variável (Fv) de camundongo (comercializado como Remicade pela Centocor/J&J, Schering-Plough). CDP571 (Celltech) é humanizado — ele é um anticorpo humano com enxerto das regiões hipervariáveis de camundongo. D2E7 (Abbott Laboratories) é “humano”, obtido a partir da biossíntese de componentes humanos. O PEGylated Fab é produzido pela Celltech (Farmacia). **b) receptores de TNF (TNFRs).** Lenercept (Roche) é um dímero do receptor humano TNFR p55 fusionado a porção Fc de uma IgG humana. Etanercepte é um dímero do receptor humano TNFR p75 fusionado a porção Fc de uma IgG humana (comercializado como Enbrel; Wyeth/Immunex). O PEGylated é um monômero truncado com o receptor humano TNFR p55 produzido pela Amgen. PEG, polyethylene glycol; TNF, tumour-necrosis factor. Adaptado de: Feldmann, 2002.

1.1.6 – Efeito do tratamento com biológicos

A utilização destes agentes biológicos, ou imunoterapias, tem contribuído no controle de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide, artrite psoriática, doença de Crohn, e mais recentemente, na psoríase (Gardam et al., 2003; Krueger et al., 2003; Mease et al., 2000), todas elas tendo como denominador comum a importante participação de TNF- α na sua imunopatogênese. Por outro lado o

emprego dessas substâncias vem sendo associado ao aumento de casos de reativação de tuberculose (TB) nos países desenvolvidos, onde esta modalidade de tratamento é mais utilizada (Gardam et al., 2003; Long & Gardam 2003; Victor & Gottlieb, 2002).

Estudos realizados por Gomez-Reino et al., (2003), e Wallis et al., (2004) em locais não-endêmicos para a TB, como Estados Unidos e Europa, comprovaram que pacientes tratados com infliximab apresentaram risco de reativação de tuberculose entre 5 a 10 vezes maior em relação à população em geral ou a pacientes que não receberam tratamento com estes inibidores.

Listing et al., em 2005, avaliaram em um estudo de coorte alemã pacientes com artrite reumatóide, e constataram que houve um aumento na taxa de risco de infecções quando comparado a tratamentos tradicionais, sendo que o aumento desta taxa foi maior entre os pacientes que fizeram uso do infliximab.

Entretanto, estes dados foram obtidos em países que apresentam baixa prevalência de tuberculose (TB). O Brasil, de acordo com a OMS, é o 15º país do mundo em prevalência da doença, 55/100.000 habitantes, com cerca de 100.000 casos de TB ativa diagnosticados anualmente (World Health Organization, 2006). Desta forma, não se sabe qual será a repercussão da utilização destas terapias, pois não há estudos do papel das mesmas na reativação de tuberculose em pacientes com psoríase, nem de outras doenças crônicas como artrite reumatóide e doença de Crohn, em regiões de alta endemicidade para TB.

1.2 – Tuberculose

A TB, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é uma doença de característica granulomatosa . A resposta imune ao Mtb é complexa e envolve muitos dos componentes do sistema imune. A IL-12 é induzida 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 (Trinchieri, 1993). Há também ativação dos linfócitos TCD8+, que podem produzir citocinas com o IFN- γ e o TNF- α e atuar como células citotóxicas (Raja, 2004).

O macrófago é considerado o principal responsável pelo controle da infecção pelo Mtb, e o IFN- γ desempenha um papel importante na ativação de seus efeitos antimicobactericidas. Esse efeito é potencializado pelo TNF- α que, embora seja inefetivo sozinho, em sinergia com o IFN- γ induz o mecanismo efetor responsável pela atividade antimicobactericida com a produção de óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de nitrogênio (RNIs) pelos macrófagos (Flynn, 2004; Ladel et al., 1997; Chan et al., 1995). Dessa forma TNF- α e IFN- γ atuam em sinergismo na formação e manutenção do granuloma (Orme et al., 2004).

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que a ausência de TNF- α leva a uma má formação do granuloma, com conseqüente comprometimento dos pulmões (Bekker et al., 2000; Smith et al., 2002).

Assim, é virtualmente esperado que o uso de bloqueadores de TNF- α , ao inibirem a atividade deste, possa favorecer a reativação da tuberculose, uma vez que interfere com a resposta imune celular do hospedeiro, que visa manter a micobactéria em focos quiescentes.

1.2.1 – Métodos para avaliação da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

A intradermoreação com PPD (Purified Protein Derivate) é o método empregado para a identificação de indivíduos com infecção latente pelo Mtb, cuja reação local determina uma resposta de hipersensibilidade tardia em indivíduos sensíveis (Lalvani, 2001).

No Brasil o PPD é realizado pela aplicação de 0,1 ml (2 UT) do PPD RT23 (cujo resultado guarda equivalência com 5 UT de PPD-S utilizado em vários países) por via intra-dérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, sendo a leitura realizada após 72 horas (Ministério da Saúde/Funasa, 2002).

A grande desvantagem do uso do PPD na identificação de indivíduos infectados é a existência de uma baixa especificidade da resposta por reação antigênica cruzada em indivíduos vacinados pelo BCG ou infectados por outra micobactérias que possuem proteínas análogas ao Mtb (Huebner et al., 1993).

In vitro a resposta imune ao Mtb pode ser avaliada através de metodologias que visam à quantificação da função imune efetora, a qual pode ser quantificada através da avaliação da expansão clonal (proliferação linfocitária) e secreção de citocinas, como o IFN- γ , frente ao estímulo com antígenos provenientes de Mtb (Hoft et al., 2002).

A proliferação linfocitária ou transformação linfocitária é o nome dado ao processo de síntese de DNA e divisão celular que ocorre nos linfócitos após algum tipo de estímulo. Os linfócitos de animais ou humanos sensibilizados proliferam em resposta ao antígeno para o qual são sensibilizados. Este processo *in vitro* está

relacionado com o processo de hipersensibilidade tardia do hospedeiro. A avaliação de proliferação linfocitária pode ser quantificada pela porcentagem de linfoblastos ou aumento da síntese de DNA. Esta avaliação pode ser feita pela adição de um precursor de DNA marcado radioativamente, geralmente a timidina tritiada (^3H -Tdr), no meio de cultura e posterior detecção da quantidade de radiação incorporada no DNA recém-sintetizado. A quantidade de ^3H -Tdr incorporada e, portanto, a síntese de DNA é determinada pela contagem de cintilação em um espectrofotômetro, o *Beta Plate*. A proliferação induzida nos linfócitos estimulados é comparada com a proliferação dos linfócitos não estimulados (Rose, 1986).

Uma modificação do enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) mais conhecido como “ELISA de sanduíche” permite a detecção de produtos secretados, como as citocinas. Esta metodologia baseia-se no emprego de anticorpos, específicos para a molécula a ser detectada, os quais se aderem à superfície dos poços existentes na placa de poliestireno permitindo que a molécula de interesse presente na amostra se ligue aos anticorpos, e seja quantificada a partir da adição de um segundo anticorpo marcado, que reconhece um epítopo diferente daquele aderido à placa. A ligação é detectada através de uma reação de troca de coloração enzima dependente e as densidades ópticas são lidas em espectrofotômetro multicanal de fibras ópticas. A concentração da amostra é feita através da conversão da leitura das densidades ópticas em unidade de peso utilizando uma curva padrão, na qual as concentrações da molécula quantificada são conhecidas (Janeway, 2008).

O ELISPOT, uma outra modificação do ELISA, permite quantificar a frequência da resposta de células T. Populações de células T são estimuladas com um antígeno de interesse em uma placa recoberta com anticorpo específico para a

citocina a ser analisada. Se uma célula T ativada estiver secretando essa citocina, ela é capturada pelo anticorpo presente na placa. Após uma breve incubação, as células são removidas, e um segundo anticorpo para a citocina é adicionado à placa para revelar um círculo de citocina ligadas na posição da célula T ativada. Contando cada “spot” e conhecendo o número de células T que foram inicialmente adicionadas à placa, pode-se calcular a frequência das células T que estão secretando a citocina em questão (Janeway, 2008).

Atualmente o único teste empregado na detecção da infecção latente por *Mtb* é a intradermorreação com o PPD que, embora seja útil na prática clínica, apresenta limitações (acima citadas) criando a necessidade da aplicação de técnicas que apresentem maior sensibilidade e especificidade. Assim foram desenvolvidos testes comerciais, que empregam as metodologias de ELISA e ELISPOT, e visam detectar a infecção latente por *Mtb* através da quantificação de IFN- γ secretado por células sensibilizadas pelos seus antígenos. Nestes testes são empregados os antígenos early secreted antigenic target (ESAT-6) e culture filtrate protein (CFP-10) que são mais específicos ao *Mtb* (Pai, 2006).

1.2.2 – Antígenos empregados na avaliação *in vitro* da infecção latente por *Mtb*

Vários antígenos têm sido utilizados para avaliar a resposta imune *in vitro* ao *Mtb*. O sonicado de *Mtb* (AgSMtb) é um complexo antigênico, ou antígeno bruto, obtido a partir da sonicação da cepa H37Rv, contendo um elevado número de diferentes componentes, alguns dos quais são semelhantes ao PPD, utilizado na intradermorreação, uma vez que o PPD é um precipitado de mais de 200 antígenos de *Mtb* (Lalvani, 2001). Apesar de apresentar reação cruzada com o BCG e outras

micobactérias ambientais, tanto o AgSMtb como o PPD são utilizados na determinação da resposta imune *in vitro* para Mtb (Mendonça, 2007; Pereira, 2003).

Mais recentemente os antígenos purificados de Mtb vêm sendo estudados como possíveis candidatos na substituição do BCG em vacina e empregados em testes comerciais que visam à detecção da infecção latente por MTB. Como forte candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra o Mtb foi isolada uma micolil-transferase, com papel essencial na síntese da parede celular da micobactéria, pertencente ao complexo antígeno 85 [Betley, 1999]. Este antígeno é capaz de desencadear uma forte resposta celular no hospedeiro e é candidato a componente vacinal contra TB (Dietrich et al., 2006; Langermans et al., 2005). Já em estudos de avaliação da resposta imune anti-Tb, este antígeno é útil na verificação da existência de memória imunológica para o Mtb (Bennekov, 2006; Grover, 2006).

Testes comerciais utilizados na detecção de infecção latente por Mtb empregam, como um dos estímulos, a proteína ESAT-6 (Specific Early Secreted Antigen Target 6 kDa), na quantificação da produção de IFN- γ por células T de memória central e de células T de memória efetora secretoras de IFN- γ . O emprego do ESAT-6 aumenta a especificidade do teste, devido ao fato desta proteína ser codificada pela região RD1 do genoma do Mtb, a qual está deletada na cepa BCG (Ravn et al., 1999; Harboe et al., 1996), e ser compartilhada por um número pequeno de micobactérias (*Mycobacterium kansasii*, *sulgai*, *flavescens* e *marinum*) [Chapman et al., 2002], evitando assim reações cruzadas (Pai, 2004).

1.3 – Diretrizes para aplicação do tratamento com inibidores de TNF- α

Como forma de prevenção de reativação da tuberculose, foram determinadas diretrizes para o diagnóstico de infecção latente por *Mtb* em todos os pacientes antes do uso de bloqueadores de TNF- α . Essas diretrizes incluem pesquisa de possível exposição a contactantes com tuberculose, teste cutâneo de hipersensibilidade tardia a tuberculina (PPD) e radiografias do tórax. A reatividade ao PPD e/ou alterações radiográficas são consideradas como indicativas de infecção pelo *M. tuberculosis*. A profilaxia deve ser feita com a utilização de isoniazida por um período de seis meses, sendo aconselhado que a profilaxia seja concluída antes de iniciar o tratamento com os bloqueadores de TNF- α (Gardam et al., 2003; Long & Gardam, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A terapêutica com os inibidores de TNF- α tem se mostrado muito efetiva no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, porém a aplicação desta terapêutica foi associada ao aumento de casos de reativação de tuberculose em países aonde a prevalência da doença é relativamente baixa. Como prevenção foram adotadas diretrizes que visam à detecção da infecção latente por Mtb e a profilaxia antes do início do tratamento.

Estas mesmas diretrizes são aplicadas no Brasil sem, entretanto, levar em conta o diferente estado imunitário de nossa população, decorrente da freqüente exposição ao Mtb, da vacinação obrigatória (>90% de cobertura) com BCG e o fato de que a positividade ao PPD não obrigatoriamente indica infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Tanji, 2005). Então não se é sabido qual será o impacto desta medicação em um país endêmico como o Brasil.

Assim a relevância deste estudo encontra-se na necessidade do conhecimento da capacidade de resposta imune anti-Tb em pacientes com psoríase grave, para os quais em 2005 a ANVISA liberou a utilização dos inibidores de TNF- α para o tratamento, e de que maneira o bloqueio do TNF- α interfere nesta resposta.

3. OBJETIVO

Estudar a resposta imune *in vitro* de pacientes com psoríase grave, reatores ou não ao PPD, a antígenos do *M. tuberculosis*, por meio da avaliação da resposta linfoproliferativa e produção de citocinas, verificando também o efeito dos inibidores de TNF- α nesta resposta.

4. CASUÍSTICA

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e aprovado pela mesma.

Foram obtidos os consentimentos informados, aprovados pela referida Comissão, de todos os pacientes bem como dos voluntários sadios que participaram dos grupos controles.

Os exames imunológicos específicos (descritos a seguir) foram realizados no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências 56 (LIM 56) do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP.

4.1 Pacientes e controles

No período de Janeiro de 2006 a Janeiro de 2008, 42 pacientes com psoríase apresentando lesões que comprometiam 10% ou mais da superfície corpórea, sem tratamento a pelo menos três meses e sem histórico de co-morbidades (neoplasias, diabetes, pneumopatias, doenças autoimunes e Aids) que procuraram atendimento no ambulatório de Psoríase do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, foram encaminhados para realizar o teste de intradermorreação com PPD no serviço de Imunologia do hospital acima referido. O teste foi realizado com 2 UT, PPD – purified Protein Derivative (Serum State Institute, Copenhagen, Suécia) e a leitura foi realizada após 72h. Os parâmetros adotados pelo serviço de Imunologia do hospital das Clínicas para a avaliação do

teste são: formação de nódulo de 0-5 mm negativo; 6 – 10 mm fraco reator; >10 mm forte reator.

Foram estudados 24 pacientes, os quais assinaram o consentimento livre e esclarecido. Os dados dos pacientes se encontram na tabela 1, e estes foram divididos em dois grupos de acordo com a reatividade ao teste de intradermorreação com PPD, sendo que o grupo de pacientes PPD (-) é composto por 14 indivíduos e o grupo de pacientes PPD (+) por 10 indivíduos.

Em uma segunda etapa houve a participação de pacientes com a forma entre leve a moderada da psoríase, os quais também foram submetidos ao teste de intradermorreação. Onze pacientes foram estudados, sendo que todos estes foram negativos ao teste (Tabela 1).

Utilizamos como controles 26 indivíduos saudáveis, os quais tinham realizado a intradermorreação recentemente (nos últimos dois anos), que foram divididos também de acordo com a reatividade ao teste com PPD, sendo 13 PPD (-) e 13 PPD (+) (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos controles e pacientes

	Controles	Controles	Pacientes	Pacientes	Pacientes leve a moderada PPD
	PPD (-)	PPD (+)	PPD (-)	PPD (+)	(-)
n	13	13	14	10	11
Idade* (anos)	35 (25,5 - 43)	41 (31,5 - 50,5)	44,5 (36 - 52)	45 (29 - 62)	48 (23,5 - 54,4)
Gênero (M/F)	4/9	5/8	10/4	8/2	5/5
PPD (mm)	0	15 (15 - 22)	0	15 (10 - 19)	0

*Dados sobre idade estão representados em média (mínimo - máximo).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Antígenos e mitógeno

Nos ensaios imunológicos utilizamos três antígenos e um mitógeno.

Em relação aos antígenos para avaliar a resposta imune anti-Mtb, utilizamos antígeno bruto obtido por sonicação de cepa Mtb-H37Rv (5 µg/ml), e os antígenos purificados ESAT-6 (5 µg/ml), para avaliar infecção recente, e Ag85B (2,5 µg/ml), para avaliar memória imunológica. Estes antígenos foram testados e padronizados em nosso laboratório.

Como mitógeno foi usada a Fitohemaglutinina (PHA) [Sigma], na diluição preconizada e em uso no nosso laboratório (2,5 µg/ml).

5.2 Separação de Células Mononucleares

Foram colhidos 40 ml de sangue em tubo estéril heparinizado, dos pacientes e controles. 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 estas lavadas em solução salina por duas vezes e acertada a concentração para $2,5 \times 10^6$ células/ml em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro AB humano (Sigma) para o ensaio de linfoproliferação e 2×10^6 células/ml para o ensaio de ELISPOT. A viabilidade celular foi realizada com o uso do Azul de Trypan (0,4%) na proporção 1:2, e esteve sempre acima de 90%.

5.3 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico para Ensaio de Linfoproliferação

As células foram cultivadas em placas de 96 poços (Costar, USA) em volume de 100 µl contendo $2,5 \times 10^5$ de PBMC, em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro AB humano, preparado em nosso Laboratório, e suplementado com gentamicina (10 mg/mL). Estas foram mantidas em estufa (Forma Scientific) a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ por períodos de 7 dias. Antígenos ESAT-6 (gentilmente cedido pela Dr. Annemiek Geluk, da Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda), o Ag85B (obtido por meio do programa “Tuberculosis Vaccine Testing and reagent Materials Contract” da Colorado State University, Colorado, Estados

Unidos da América) e antígeno bruto (sonicado de *Mycobacterium tuberculosis*), gentilmente cedido pelo Prof. Moisés Palaci, do núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (TANJI, 2005) e mitógeno PHA foram adicionados em seus respectivos poços em volumes de 100 µl/poço. Dezoito horas antes do término do cultivo, as culturas foram pulsadas com timidina tritiada ([methyl ³ HTdr] thymidine 74 GBq/mmol - Amersham International, UK), 1 µCi/poço e as culturas aspiradas com auxílio de coletor de células automático (Mach II, Tomtek) em membranas de nitrocelulose (Flow Laboratories). As culturas foram realizadas em triplicata, sendo que, uma se desenvolveu na ausência dos bloqueadores de TNF-α, enquanto que, nas outras foram adicionados os bloqueadores de TNF-α (infiximab, gentilmente cedido pela Schering-Plough do Brasil SA; etanercepte, gentilmente cedido por Wyeth-Whitehall do Brasil SA) nas concentrações finais de 5 µg/ml de infiximab e 40 µg/ml de etanercepte. Estas concentrações foram obtidas através de uma curva dose-resposta, com as concentrações dos inibidores variando de 2,5 - 40 µg/ml, de dosagem de TNF-α (por ELISA). Conseguindo-se com a concentração de 5 µg/ml de infiximab total inibição de TNF-α, enquanto que, com o etanercepte a total inibição do TNF-α só foi alcançada com a concentração de 40 µg/ml (dados não mostrados).

A radioatividade incorporada foi medida em contador Betaplate 1205 (Wallac) e o resultado apresentado em índice de estimulação (média aritmética de triplicatas de poços estimulados dividido pela média aritmética de poços não estimulados) [Rocha, 2006].

Para a dosagem de IFN-γ, TNF-α e IL-10 em sobrenadantes de cultura, os PBMCs foram cultivados como descrito acima em presença de PHA, ESAT-6,

Ag85B, Antígeno Sonicado de *Mycobacterium tuberculosis* e meio de cultura somente (controle negativo) e em volumes finais de 200 µl em placas de 96 poços.

Os sobrenadantes para dosagem de TNF- α e IL-10 foram coletados com 48 horas de cultivo, enquanto os sobrenadantes para dosagem de IFN- γ foram coletados com 120 horas de cultivo; ambos foram centrifugados para eliminar debris celulares. Foram aliquotados, sendo conservados a -70°C até a dosagem das citocinas por ELISA. Sobrenadantes para dosagens de IFN- γ foram coletados da cultura estabelecida para linfoproliferação, tanto a realizada na ausência quanto na presença dos inibidores de TNF- α .

5.4 Determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-10 em Sobrenadantes de Cultura de PBMC por ELISA.

Microplacas de poliestireno com 96 poços (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-TNF- α , anti-IFN- γ ou anti-IL-10 (2,5 µg/ml, Endogen, SA) e incubadas 4°C “overnight”. As microplacas foram bloqueadas com tampão fosfato (PBS, pH 7,6) com 4% de soro albumina bovina por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas com Tris HCl 5 mM, 0,02 % Tween. Os sobrenadantes, curva padrão (10–1000 pg/ml) e anticorpo monoclonal humano biotinelado anti-TNF- α , anti-IFN- γ ou anti-IL-10 (1µg/ml, Endogen USA) foram adicionados aos poços e as placas permaneceram 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem com Tris HCl 5mM 0,02% Tween foi adicionada estreptoavidina-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 150 pg/ml.

5.5 Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ por ELISPOT

Cada poço de uma placa de ELISPOT (Multiscreen – 96 poço filtration plate, 4510, Millipore) foi sensibilizado em ambiente estéril com 4 μ g/ml de anti-IFN- γ (M-700A-Endogen) diluído em tampão carbonato-bicarbonato, 100 μ l por poço, que se ligaram à base de nitrocelulose da placa.

A placa foi incubada “overnight” a 4°C, e após esse período, foi 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 placa foi novamente lavada duas vezes com PBS, em ambiente estéril e 2x10⁵ PBMC em 100 μ L de RPMI+ SAB₂ 10% aplicadas em cada poço, em triplicata. Foram adicionados mitógeno (PHA) e antígenos (sonicado de Mtb, ESAT-6 e 85B), conforme padronização prévia (TANJI, 2005). O ensaio para quantificação de células produtoras de spots para IFN- γ foi realizado na presença e na ausência dos

bloqueadores de TNF- α , na concentração de 5 μ g/ml de infliximab e 40 μ g/ml de etanercepte. A placa foi então incubada por 18 horas a 37° C, cessado o período de incubação o conteúdo da placa foi desprezado e a mesma lavada 10 vezes manualmente, com PBS 0,05% de Tween 20, após este procedimento foi adicionado o anti-IFN- γ biotinelado (M-701B – Endogen) na concentração de 1 μ g/ml, diluído em tampão PBS 1% de BSA₂ e incubado por 2 horas a 37°C. Após este período a placa foi lavada 10 vezes manualmente, com PBS 0,05% de Tween 20, terminado este procedimento foi adicionado 100 μ l por poço de estreptoavidina-fosfatase alcalina, previamente diluída 1:6000 em PBS 1% de BSA e incubada a 37° C por 1 hora. Em seguida, a placa foi novamente lavada 10 vezes manualmente com PBS 0,05% de Tween 20 e, em seguida, foi colocado 50 μ l por poço da solução substrato (NBT - BCIP), incubando-se a placa no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi desprezado todo líquido contido na placa e para assegurar a parada de reação, esta foi lavada 20 vezes com H₂O deionizada. A placa foi seca com lenço de papel e deixada no escuro por 24 horas, quando foi revelado um produto insolúvel formando *spots* que representam áreas de captura das citocinas secretadas pelas células adjacentes.

As leituras dos *spots* foram realizadas no leitor automatizado de ELISPOT Axioplan 2 KS ELISPOT (Carl Zeiss Vision – Germany). Consideramos 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).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com os ensaios imunológicos foram transformados em logaritmo, devido a sua distribuição heterogênea, e então às comparações entre os grupos de pacientes e seus respectivos controles foram realizadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Na análise dos resultados obtidos com os inibidores utilizamos o teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 Avaliação da resposta imune inespecífica dos pacientes

Primeiramente, com o intuito de verificar a capacidade de resposta imune não específica dos pacientes, foi empregada a estimulação por um mitógeno, a fitohemaglutinina (PHA). Os dados obtidos de pacientes com psoríase grave, quando comparados com os controles, mostraram que estes têm uma tendência a uma menor resposta linfoproliferativa (medianas do IE de 71,1 vs 102, 7, respectivamente: $P=0,056$) e produção de IFN- γ (medianas em pg/ml de 1708 vs 6408, respectivamente; $P=0,054$).

7.2 Avaliação da resposta imune *in vitro* aos antígenos micobacterianos dos pacientes com psoríase grave

A avaliação da resposta imune aos antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* foi realizada através da análise da linfoproliferação, dosagem de IFN- γ e quantificação de células produtoras de IFN- γ .

A comparação entre os pacientes e controles PPD (-) frente ao antígeno bruto sonificado (AgSMtb) mostrou que os pacientes apresentaram resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ reduzidas em relação aos controles (medianas do IE: 4,5 vs 37,1; $P=0,0001$ [Figura 3A] e 55,5 pg/ml vs 2464 pg/ml, $P=0,004$ [Figura 4A]). No entanto, a quantificação de células produtoras de IFN- γ mostrou

que 13 pacientes (85%) apresentaram células produtoras de IFN- γ em proporção comparável a do grupo controle (11/11) [Tabela 2].

Os ensaios realizados com antígenos purificados mostraram que a resposta linfoproliferativa frente à estimulação pela proteína recombinante 85B (Ag85B) apresentou-se reduzida nos pacientes PPD (-) em relação aos seus controles (medianas do I.E de 2,5 e 8, respectivamente; $P= 0,007$) [3B]. Não houve diminuição da produção de IFN- γ dos pacientes em relação aos controles, apesar da diferença das medianas de produção (medianas de 32 vs 620 pg/ml, respectivamente, $P>0,05$) (Figura 4B). Células produtoras de IFN- γ foram detectadas em 7 dos 13 pacientes PPD (-), e em 8 dos 11 controles ($P>0,05$) [Tabela 2].

A linfoproliferação frente ao ESAT-6 também se mostrou reduzida nos pacientes PPD (-) em relação aos seus controles (medianas do IE: 2,5 vs 7,7, respectivamente; $P= 0,003$) [Figura 3C]. Curiosamente o grupo controle apresentou um número elevado de indivíduos respondedores para este antígeno (10 em 13 indivíduos), visto que a não reatividade ao PPD indicaria ausência de infecção pelo Mtb, e, portanto, o não reconhecimento deste antígeno específico de Mtb. A secreção de IFN- γ foi baixa em ambos os grupos (Figura 4C). O mesmo padrão de resposta foi obtido na quantificação de células produtoras de IFN- γ , onde pacientes e controles apresentaram equivalente proporção de positividade ao ensaio (7/10 e 7/13, respectivamente; $P> 0,05$) [Tabela 2].

Figura 3. Resposta linfoproliferativa medida por incorporação de timidina tritiada frente aos estímulos: (A) AgSMtb (antígeno bruto sonicado da cepa H37Rv); (B) Ag85B (proteína recombinante 85B); (C) ESAT-6 (early secreted antigenic target 6). Diferenças significativas foram observadas na resposta linfoproliferativa na comparação dos grupos Controle PPD(-) vs. Psoríase PPD (-) frente a estimulação com os 3 antígenos. Medianas da proliferação espontânea (cpm) foram: 331 (Controles PPD [-]), 482 (Pacientes PPD [-]), 426 (Controles PPD [+]) e 342 (Pacientes PPD [-]), não havendo diferença significativa entre elas. I.E. = Índice de estimulação.

Figura 4. Dosagem da secreção de IFN- γ frente aos estímulos: (A) AgSMtb (antígeno bruto sonificado da cepa H37Rv); (B) Ag85B (proteína recombinante 85B); (C) ESAT-6 (early secreted protein target-6). Diferença significativa observada na comparação dos grupos Controle PPD (-) vs. Pacientes PPD (-) frente à estimulação com AgSMtb. A produção de IFN- γ na condição basal foi indetectável.

Tabela 2. Quantificação por ELISPOT de células secretoras de IFN- γ (CFS/milhão) em resposta a antígenos de Mtb em pacientes psoríase grave reatores ou não a intradermoreação com PPD

	Controles PPD (-)	Pacientes PPD (-)	Controles PPD (+)	Pacientes PPD (+)
	Positivos/total	Positivos/total	Positivos/total	Positivos/total
AgSMtb	11/11 171 (83,8 - 283)*	11/13 112 (35,8 - 240)*	12/13 262 (89,8 - 540)*	8/10 130,5 (29,8 - 203,5)*
Ag85B	8/11 31,5 (20,8 - 92,5)*	6/13 20 (17,5 - 60,8)*	13/13 168 (59 - 489)*	8/10 60 (25,3 - 141,5)*
ESAT-6	7/11 38 (10,8 - 190)*	7/13 25 (7 - 63,3)*	11/13 83,5 (33 - 193)*	6/10 50,75 (1 - 127,5)*

*Dados apresentados em medianas (percentis 25 – 75%)

Diferentemente dos pacientes PPD (-), os pacientes PPD (+) não apresentaram diminuição em sua capacidade linfoproliferativa frente aos antígenos de Mtb em comparação ao seu grupo controle, os indivíduos sadios PPD (+) [figura 3]. Resposta similar foi obtida na dosagem da secreção de IFN- γ (figura 4).

Os pacientes PPD (+), em sua grande maioria, apresentaram células secretoras de IFN- γ tanto pela estimulação com o antígeno bruto (AgSMtb), como pelos antígenos purificados Ag85B e ESAT-6 (Tabela 2).

7.3 Avaliação da influência do grau de gravidade da psoríase na resposta imune aos antígenos micobacterianos

A diminuição da capacidade imune de responder aos antígenos de Mtb verificada nos pacientes PPD (-) levou ao questionamento de uma possível interferência do grau de gravidade da psoríase, uma vez que a psoríase é ocasionada

pela exacerbação da resposta imune do tipo Th1 na pele, havendo então a possibilidade desta desregulação ser proporcional a área corpórea acometida.

Para avaliar esta possibilidade utilizamos um grupo de 11 pacientes com psoríase leve a moderada PPD (-) e analisamos sua resposta linfoproliferativa e dosagem de IFN- γ frente aos antígenos de Mtb, e comparamos a resposta deste grupo com os grupos de indivíduos sadios PPD (-) e pacientes com psoríase grave PPD (-).

A estimulação pela PHA mostrou que os pacientes com psoríase leve a moderada apresentam uma resposta intermediária entre os grupos controle e pacientes com psoríase grave em relação à resposta linfoproliferativa, porém não estatisticamente significativa, com elevada produção de IFN- γ (tabela 3).

Tabela 3. Medianas (percentis 25 – 75%) da resposta linfoproliferativa (I.E) e secreção de IFN- γ (pg/ml) frente à estimulação com PHA

	Controles PPD (-)	Pacientes Graves PPD (-)	Pacientes Leve a Moderada PPD (-)
I.E (linfoproliferação)	110 (88 - 157) n= 12	63 (47 - 95) n= 14	68 (31 - 113) n= 11
IFN-g (ELISA)	7135 (3441 - 16230) n= 10	1171 (591,5 - 2654) n= 14	11186 (159 - 50760) n= 10

A linfoproliferação induzida por AgSMtb mostrou que o grupo dos pacientes psoríase leve a moderada possui uma resposta semelhante ao grupo controle, e superior a do grupo paciente psoríase grave (medianas do IE: 17,9 vs. 37 vs. 4,5, respectivamente; $P < 0,05$) [figura 5A]. O mesmo perfil de resposta foi encontrado na dosagem de IFN- γ (medianas em pg/ml de: 2143 vs 2464 vs 55,5, respectivamente; $P < 0,05$) [figura 6A].

Figura 5. Resposta linfoproliferativa frente aos estímulos: (A) AgSMtb; (B) Ag85B; (C) ESAT-6 . Diferenças significativas entre: Controle PPD (-) vs. Psoríase Grave frente aos 3 estímulos; Psoríase leve a moderada vs. Psoríase Grave frente ao AgSMtb; Controle PPD (-) vs. Psoríase leve a moderada frente ao Ag85B e ESAT-6. Medianas da proliferação espontânea (cpm) foram: de 331 (Controles PPD [-]), 774 (Pacientes leve a moderada PPD[-]) e 482 (Pacientes grave PPD [-]).

A estimulação com o Ag85B mostrou que os pacientes psoríase leve a moderada, assim como os pacientes psoríase grave, apresentaram uma resposta linfoproliferativa menor que os controles PPD (-) [medianas do I.E: 3,9, 2,5, 8, respectivamente; $P < 0,05$] (figura 5B). A proporção de pacientes com psoríase leve a moderada IFN- γ respondedores foi de 5/11 (45%), proporção comparável ao do grupo controle, com 7/11 (64%), e superior ao grupo dos pacientes com psoríase grave, com 4/15 (27%). Apesar da ausência de significância, os dados sugerem que os pacientes com psoríase leve a moderada têm uma produção de IFN- γ intermediária entre o grupo controle e grupo de pacientes com psoríase grave (figura 6B).

Figura 6. Dosagem da secreção de IFN- γ frente aos estímulos: (A) AgSMtb; (B) Ag85B; (C) ESAT-6. Diferenças significativas nas comparações: Controle PPD (-) vs. Psoríase grave e Psoríase leve a moderada vs. Psoríase grave frente à estimulação com AgSMtb. A produção de IFN- γ na condição basal foi indetectável. $n = 10$ do grupo de Pacientes leve a moderada frente ao estímulo ESAT-6.

A resposta linfoproliferativa e a dosagem de IFN- γ dos pacientes com psoríase leve a moderada frente à estimulação com ESAT-6 foram baixas, assim como nos pacientes com psoríase grave, porém sem significância quando comparadas ao grupo controle (medianas do I.E: 1,9, 2,5, 7,7; medianas em pg/ml: 63,5, 92, 38; respectivamente) [figura 5C e 6C].

7.4 Avaliação da inibição de TNF- α na resposta imune aos antígenos micobacterianos

A segunda parte do nosso estudo teve como intuito verificar o efeito da inibição de TNF- α na resposta celular aos antígenos do Mtb. Há a hipótese de que a inibição de TNF- α levaria a uma diminuição da resposta imune, o que possivelmente explicaria a observação clínica de que pacientes ao fazerem uso de um dos inibidores do TNF- α tornam-se mais susceptíveis à reativação da TB. Com a finalidade de testar esta hipótese, realizamos ensaios de linfoproliferação, quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 e quantificação de células produtoras de IFN- γ por ELISPOT em três condições experimentais; 1- na ausência dos inibidores; 2- na presença de infliximab e 3 - na presença de etanercepte, utilizando os antígenos AgSMtb, Ag85b, ESAT-6 e o mitógeno PHA.

A literatura mostra que pacientes que fizeram uso do infliximab apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções, incluindo a reativação de tuberculose, do que os pacientes que fizeram uso do etanercepte (Listing et al., 2005; Wallis et al., 2004; Gomez-Reino et al., 2003). Com o intuito de verificar se há uma ação distinta entre os inibidores de TNF- α utilizamos PBMC dos pacientes (tanto os

PPD negativos como os positivos) e realizamos um ensaio utilizando como estímulo a PHA nas condições acima citadas. Foi então realizada a dosagem da produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura. Como mostra a figura 7, os pacientes não apresentaram uma produção espontânea de TNF- α . Em relação ao estímulo com PHA, a produção de TNF- α foi elevada (mediana de 636 pg/ml), sendo que na presença de infliximab não houve detecção da mesma, mostrando sua completa neutralização pelo infliximab (mediana de 10 pg/ml; $P < 0,05$). Em contrapartida, ao compararmos a dosagem de TNF- α nos sobrenadantes na presença de etanercepte constatamos que não houve neutralização de TNF- α pela droga (medianas em pg/ml de 636 sem inibição e de 558 com etanercepte).

Figura 7. Avaliação da ação dos inibidores de TNF- α na secreção de TNF- α frente ao estímulo PHA em pacientes com psoríase grave. PHA+ Inf = PHA na presença de infliximab; PHA+ Eta = PHA na presença de etanercepte, $n = 18$. mediana

Os estudos de inibição foram realizados somente nos pacientes e indivíduos saudáveis PPD (+), uma vez que, havendo inibição da resposta imune seria difícil detectá-la nos pacientes PPD (-), já que esta se apresenta reduzida intrinsecamente neste grupo. Assim avaliamos a resposta linfoproliferativa nos indivíduos saudáveis PPD

(+), tanto com o estímulo por mitógeno quanto com os antígenos micobacterianos. Ao estímulo com mitógeno e os antígenos Ag85B e AgSMtb, a linfoproliferação mostrou-se diminuída tanto na presença de infliximab quanto do etanercepte. O mesmo não foi observado com o estímulo ESAT-6. Estes dados estão apresentados na tabela abaixo, e na figura 8.

Tabela 4. Medianas (percentis 25-75%) da resposta linfoproliferativa dos controles PPD (+) na presença dos inibidores de TNF- α infliximab e etanercepte

	Condição Original (mediana do I.E)	Infliximab (mediana do I.E)	Etanercepte (mediana do I.E)
PHA	81 (30 - 121)	26,5 *** (13 - 45)	6 * (4 -16,5)
ESAT-6	8,2 (3 - 29)	1,6 (1,25 - 14)	1,9 (1 - 5,5)
Ag85B	19,5 (12 - 35)	3,4 *** (1,5 - 13)	2,4 ** (1 -10)
AgSMtb	26 (14 - 47)	8,5 *** (4 -19)	5 ** (2 - 21)

* P < 0,001; ** P < 0,01; *** P < 0,05, n = 13

Figura 8. Resposta linfoproliferativa frente aos antígenos do Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos saudáveis PPD (+). Observamos redução da resposta linfoproliferativa para Ag85B, AgSMtb e ao mitógeno PHA tanto na presença do infliximab quanto na presença do etanercepte. I.E = Índice de estimulação.

Em relação à produção de IFN- γ , diferentemente do esperado, não houve diminuição na resposta aos antígenos micobacterianos pela presença dos inibidores de TNF- α (figura 9).

Figura 9. Dosagem da produção de IFN- γ por ELISA frente aos antígenos do Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos saudáveis PPD (+). Não houve diminuição da secreção de IFN- γ na presença dos inibidores infliximab e etanercepte.

A produção de IL-10 ($n = 10$) frente ao estímulo com PHA permaneceu inalterada com os inibidores. Sob o estímulo do AgSMtb a produção de IL-10 sofreu inibição tanto pelo infliximab quanto pelo etanercepte (medianas de 85, 10,25 e 5,5 pg/ml, respectivamente; $P < 0,05$). Não houve uma produção suficiente de IL-10 com a estimulação por Ag85B para que houvesse a detecção de uma possível inibição pelas drogas. Frente ao antígeno ESAT-6, a produção de IL-10 foi diminuída tanto na presença do infliximab quanto do etanercepte (medianas de 332, 30,5 e 10 pg/ml, respectivamente; $P < 0,05$ e $P < 0,01$) [figura10].

Figura 10. Dosagem da produção de IL-10 por ELISA frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos sadios PPD (+). Houve diminuição da secreção de IL-10 frente aos antígenos ESAT-6 e AgSMtb na presença dos inibidores. A mesma inibição não foi verificada com o estímulo PHA.

Em relação à produção de TNF- α frente aos antígenos micobacterianos, verificamos que somente o infliximab foi capaz de neutralizar totalmente a produção desta citocina. A produção de TNF- α na presença de etanercepte se mostrou igual e, paradoxalmente em alguns casos, superior à condição original (sem modulação com inibidores) [Tabela 5 e figura 11].

Tabela 5. Medianas da produção de TNF- α nos controles PPD (+) na presença dos inibidores de TNF- α infliximab e etanercepte

	Condição original (mediana pg/ml)	Infliximab (mediana pg/ml)	Etanercepte (mediana pg/ml)
PHA (n = 11)	300 (80,5 - 1176)	indetectável***	985 (604 -1503)
ESAT-6 (n = 8)	41 (10-142,5)	indetectável	257*** (108,5 - 482)
Ag85B (n = 8)	10 (10- 52)	indetectável	164 * (124-346,5)
AgSMtb (n = 10)	397 (110,5 -620)	indetectável*	401,5 (252,5 - 629)

P < 0,001; ** P < 0,01; *** P < 0,05

Figura 11. Dosagem da produção de TNF- α por ELISA frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos indivíduos sadios PPD (+). Houve diminuição da secreção de TNF- α frente a todos os estímulos na presença do inibidor infliximab. A produção de TNF- α na presença de etanercepte se mostrou igual e, em alguns casos, superior à condição original.

A modulação da resposta com infliximab e etanercepte não promoveu diminuição do número de células produtoras de IFN- γ (i.e., quantificadas por ELISPOT) [figura 12].

Figura 12. Quantificação de células produtoras de IFN- γ por ELISPOT dos indivíduos saudáveis PPD (+). A resposta aos antígenos micobacterianos não demonstra diminuição na presença dos inibidores infliximab e etanercepte, $n=12$.

A análise do efeito da inibição de TNF- α na resposta linfoproliferativa no grupo de pacientes PPD (+) demonstrou que frente a um estímulo inespecífico como a PHA há diminuição da linfoproliferação somente na presença do etanercepte (figura 13). Em relação ao AgSMtb, dos nove pacientes que apresentaram boa resposta linfoproliferativa ao AgSMtb, quatro tiveram redução importante da mesma na presença de infliximab. Com a modulação feita com etanercepte observamos o mesmo padrão de resposta: dos nove pacientes que apresentaram magnitude das respostas proliferativas ao AgSMtb, três tiveram redução importante da mesma, porém sem diferença significativa entre as duas condições experimentais.

Setenta por cento dos pacientes PPD (+) apresentaram resposta linfoproliferativa ao estímulo com o Ag85B; destes quatro sofreram diminuição da mesma na presença de ambos os inibidores.

De forma geral, o grupo de pacientes PPD (+) apresentou uma baixa resposta linfoproliferativa ao estímulo com o ESAT-6, inferior à apresentada aos outros antígenos micobacterianos, dificultando assim a análise de uma possível inibição por parte do anti-TNF- α . Entretanto, ao fazermos a análise individual dos pacientes, verificamos que os quatro pacientes que apresentaram linfoproliferação não tiveram diminuição de suas respostas na presença dos inibidores.

Figura 13. Resposta linfoproliferativa do grupo dos pacientes PPD (+) frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α . Não houve diminuição da resposta linfoproliferativa ao mitógeno PHA e aos antígenos de Mtb na presença de infliximab, havendo inibição somente a estimulação com PHA na presença do etanercepte.

Na figura 14 observamos que, de forma geral, a produção de IFN- γ frente ao estímulo com PHA não sofreu alteração com a presença dos inibidores.

Ao analisarmos as medianas podemos observar que houve uma diminuição na produção de IFN- γ com os estímulos Ag85B e AgSMtb na presença dos inibidores: Ag85B - mediana somente com o estímulo, 2378 pg/ml; mediana com o estímulo+ infliximab, 165 pg/ml e mediana com o estímulo+ etanercepte, 863 pg/ml; AgSMtb - mediana somente com o estímulo, 2795 pg/ml; mediana com o estímulo+ infliximab, 1621 pg/ml e mediana com o estímulo+ etanercepte, 812 pg/ml. Provavelmente devido à grande variabilidade na resposta dos pacientes, essas diferenças não foram estatisticamente significantes ($P > 0,05$). Houve um leve aumento da produção de IFN- γ na estimulação com ESAT-6 na presença do etanercepte, sendo que a produção permaneceu inalterada na presença de infliximab (medianas de 327,5, 629 e 365,5 pg/ml, respectivamente).

Figura 14. Comparação da produção de IFN- γ por ELISA do grupo de pacientes PPD (+) frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α . Não houve diminuição da secreção de IFN- γ na presença dos inibidores infliximab e etanercepte.

Nos pacientes ($n = 7$), assim como nos controles, a produção de IL-10 frente ao estímulo com PHA permaneceu inalterada com os inibidores. Somente 3

indivíduos apresentaram produção de IL-10 sob o estímulo do AgSMtb, sendo que todos os 3 apresentaram uma redução da produção na presença dos inibidores. A estimulação pelo Ag85B também não levou a uma produção suficiente de IL-10 nos pacientes para que houvesse a detecção de uma possível inibição pelas drogas, assim como nos controles. Frente ao antígeno ESAT-6, a produção de IL-10 mostrou-se reduzida, tanto na presença do infliximab quanto do etanercepte, de acordo com as medianas de 95, 10 e 10 pg/ml, respectivamente, porém sem significância (figura15).

Figura 15. Comparação da produção de IL-10 por ELISA frente aos antígenos de Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos pacientes PPD (+). Houve diminuição da secreção de IL-10 na presença de infliximab e etanercepte, $n = 7$.

Apesar de haver inibição da produção de TNF- α somente frente ao estímulo PHA e AgSMtb, a produção de TNF- α induzida pelos antígenos purificados foi indetectável na presença do infliximab. Em contrapartida, a modulação com o

etanercepte frente aos mesmos estímulos mostrou manutenção da produção de TNF- α com PHA e ESAT-6, e de acordo com as medianas, um aumento na produção com Ag85B e AgSMtb (Tabela 7 e figura16), resposta similar a dos indivíduos sadios PPD (+).

Tabela 6. Medianas (percentis 25 – 75%) da produção de TNF- α nos pacientes PPD (+) na presença dos inibidores de TNF- α infliximab e etanercepte.

	Condição Original (mediana pg/ml)	Infliximab (mediana pg/ml)	Etanercepte (mediana pg/ml)
PHA	560 (49-1767)	indetectável *	566 (146,5-773,5)
ESAT-6	114 (10-615)	indetectável	164 (40,5-453)
Ag85B	21 (10-515,5)	indetectável	193 (110,5-283,5)
AgSMtb	155 (35,5-591)	indetectável*	331 (68,5-491,5)

*P< 0,05; n= 9

Figura 16. Comparação da produção de TNF- α por ELISA frente aos antígenos do Mtb na ausência e presença dos inibidores de TNF- α dos pacientes PPD (+). Houve diminuição da secreção de TNF- α frente ao estímulo com PHA e AgSMtb na presença de infliximab, $n = 9$.

Assim como nos controles PPD (+), não houve alteração do número de células produtoras de IFN- γ frente à estimulação com mitógeno e com os antígenos micobacterianos sob a modulação dos inibidores de TNF- α nos pacientes PPD (+) [figura17]. A maioria dos pacientes apresentaram respostas positivas aos 3 antígenos, as quais persistiram na presença dos inibidores; as poucas respostas negativas também não se modificaram.

Figura 17. Quantificação de células produtoras de IFN- γ por ELISPOT dos pacientes PPD (+). A resposta aos antígenos micobacterianos não demonstrou diminuição na presença dos inibidores infiximab e etanercepte, $n=9$.

8. DISCUSSÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, na qual o TNF- α desempenha um importante papel em sua imunopatogênese. O emprego de agentes biológicos capazes de inibir a atividade de TNF- α tem se mostrado eficiente no tratamento não somente da psoríase, mas também no tratamento de outras doenças inflamatórias crônicas. Porém, a utilização desta terapêutica foi associada a um aumento da taxa de infecções, dentre elas a reativação de tuberculose, entre os pacientes que fizeram uso dos inibidores de TNF- α (Gardam, et al., 2003; Long & Gardam, 2003; Victor & Gottlieb, 2002).

A intradermoreação com PPD, radiografia do tórax e pesquisa de possíveis contactantes com tuberculose foram diretrizes adotadas para a detecção de infecção latente por Mtb em pacientes candidatos a imunoterapia com os inibidores de TNF- α . Alterações radiográficas e/ou reatividade ao PPD são indicativas de infecção latente, levando a profilaxia antes do início do tratamento com os inibidores (Gardam et al, 2003; Long & Gardam, 2003). As mesmas diretrizes para a detecção de infecção por Mtb têm sido adotadas no Brasil, porém sem maiores definições de qual(s) conduta(s) a serem tomados em caso de infecção nos pacientes com psoríase candidatos ao tratamento (Azulay-Abulafia & Gripp, 2006). Também não foram levados em consideração a condição endêmica do Mtb no país, o estado imunitário da população (que é vacinada na primeira infância com o BCG) e a sua constante exposição à Mtb.

Muito tem se estudado sobre o efeito destes biológicos em pacientes com artrite reumatóide, devido à liberação dos biológicos para o seu tratamento ter

ocorrido em 1998 (Tzu & Kerdel, 2008), porém há pouco conhecimento a respeito dos efeitos da aplicação dos inibidores no tratamento da psoríase, bem como do estado imunitário destes pacientes em relação ao Mtb.

Assim a proposta do presente estudo foi a de avaliar tanto a resposta imune de pacientes com psoríase grave, candidatos mais prováveis ao tratamento com os biológicos, e o efeito dos inibidores nesta resposta.

A avaliação foi realizada através da análise da capacidade linfoproliferativa, produção de IFN- γ e a quantificação de células produtoras de IFN- γ dos pacientes com psoríase grave frente a antígenos do Mtb, e em uma segunda etapa, o efeito da modulação dos inibidores de TNF- α nesta capacidade.

Houve divisão dos pacientes em dois grupos de acordo com a reatividade a intradermoreação ao PPD, uma vez que este teste é uma das ferramentas adotadas pelas diretrizes com a finalidade de detectar infecção latente por Mtb. Como parâmetro de comparação foi utilizado um grupo de indivíduos sadios subdivididos também de acordo com a reatividade a intradermoreação ao PPD.

A escolha dos antígenos AgSMtb e Ag85B, apesar dos mesmos serem compartilhados por outros tipos de micobactérias patogênicas e ambientais, portanto não podendo ser considerados específicos de Mtb (Arend et al, 2002), foi baseada na capacidade dos mesmos de serem úteis para verificar a presença de memória imunológica para o Mtb. O Ag85B é um importante candidato no desenvolvimento de vacina contra Mtb pelo fato deste antígeno desencadear uma forte resposta celular no hospedeiro humano (Bennekov et al., 2006; Grover et al., 2006).

Diferentemente dos outros antígenos utilizados, o ESAT-6 está preferencialmente relacionado à infecção recente, sendo menos utilizado para

avaliação de memória central e mais utilizado em ensaios de ELISPOT como marcador de infecção recente (identificando células T memória efetora) [Scholvinck et al., 2004; Vekemans et al., 2001].

O teste de intradermoreação realizado com os pacientes que procuraram atendimento no ambulatório de Psoríase do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas, no período de Janeiro de 2006 a Janeiro de 2008, mostrou uma baixa frequência de reatividade ao PPD pelos pacientes, uma vez que dos 42 pacientes submetidos ao teste somente 12 (29%) apresentaram reatividade ao teste. Essa baixa frequência de reatividade ao teste intradérmico com PPD não era esperada uma vez que a população do estudo é vacinada com BCG na primeira infância e está em permanente exposição à micobactérias ambientais, e possivelmente ao próprio *Mtb*, como foi evidenciado em nosso meio por Ueki et al. (2005). Reforça esta noção de menor frequência de reatividade ao *Mtb* nos pacientes com psoríase o estudo feito em população de funcionários do Hospital das Clínicas, em que o grupo mais representativo de uma população geral, isto é, não expostos ao *Mtb* profissionalmente ou por contato familiar, apresentou uma taxa elevada (51%) de positividade ao PPD (Souza, 1999).

A avaliação *in vitro* da resposta imune frente ao AgSMtb mostrou que os pacientes PPD (-) apresentaram baixa linfoproliferação e produção de IFN- γ quando comparados ao seu grupo controle, o mesmo ocorrendo em relação a estimulação com Ag85B. Somente na quantificação de células produtoras de IFN- γ verificou-se que os pacientes apresentaram número de células produtoras de IFN- γ frente aos dois antígenos semelhantes ao do seu grupo controle. Em relação ao ESAT-6, os pacientes PPD (-) também apresentaram uma diminuição da resposta

linfoproliferativa, porém não da secreção de IFN- γ , quando comparados a seu grupo controle. Houve também semelhança no número de células produtoras de IFN- γ entre os dois grupos. Já os pacientes PPD (+) apresentaram respostas imunes frente aos três tipos de antígenos micobacterianos similares ao de seu grupo controle com as três metodologias empregadas.

A princípio a baixa reatividade *in vitro* dos pacientes PPD (-) e controles PPD (-) poderia ser vista como algo esperado, uma vez que a negatividade ao PPD é interpretada clinicamente como ausência de infecção pelo Mtb. Porém os controles PPD (-) apresentaram resposta linfoproliferativa e secreção de IFN- γ frente aos antígenos micobacterianos, semelhante ao grupo de indivíduos sadios PPD (+). A diferença surgiu somente na comparação da quantificação de células produtoras de IFN- γ , na qual os controles PPD (-) apresentaram medianas do número de células produtoras de IFN- γ inferiores ao dos controles PPD (+). Pela técnica de ELISPOT avaliamos preferencialmente células T de memória efetora, as quais já estão diferenciadas e aptas para rapidamente exercer sua resposta efetora após entrar em contato com o antígeno. Portanto a resposta imune desencadeada por estas células dispensaria etapas necessárias às células naíves para que estas possam efetuar suas funções. Talvez estas células T estejam implicadas na reatividade ao PPD no teste de intradermorreação. Este teste avalia a hipersensibilidade do tipo tardia na quais as células de memória, devido a uma exposição antigênica anterior, estão aptas a responder com rapidez a presença de antígenos na pele, sendo que o início do surgimento do nódulo, que indica a inflamação decorrente do influxo de linfócitos T ativados, ocorre já nas primeiras 48 horas após a intradermorreação. Desta forma, os controles PPD (-) teriam menor número de células de memória efetora relacionadas a

estes antígenos, por isso a não reatividade ao PPD, mas teriam células de memória central, devido a uma sensibilização prévia ocasionada pela vacinação ou pela exposição à micobactérias ambientais, evidenciadas através da resposta linfoproliferativa e da secreção de IFN- γ . Assim, a não reatividade a intradermoreação com PPD não é necessariamente indicativa de ausência de resposta imune de memória central aos antígenos de Mtb. Portanto a baixa reatividade *in vitro*, evidenciada pela baixa resposta linfoproliferativa e secreção de IFN- γ , observada nos pacientes PPD (-) não pode ser explicada pela não reatividade *in vivo* ao PPD.

Bay et al., 1998, verificaram que pacientes com psoríase apresentavam uma resposta celular reduzida a antígenos brutos de diferentes tipos de micobactérias, dentre elas o Mtb. Entretanto, neste estudo não houve divisão dos pacientes de acordo com a gravidade da doença e não havia a informação a respeito do tratamento, se os pacientes se encontravam em tratamento e qual era o tipo, e se estes foram ou não submetidos à intradermoreação com PPD. Além disso, não houve a avaliação da resposta celular a antígenos purificados do Mtb.

Mecanismo semelhante de diminuição de resposta celular foi verificado em pacientes com artrite reumatóide. Esta diminuição não é inteiramente compreendida, porém há estudos que investigaram este aspecto, avaliando diferentes etapas envolvidas no desencadeamento da resposta imune celular a mitógenos e antígenos, na tentativa de explicá-la. EMERY et al., 1985, estudaram a resposta linfoproliferativa *in vitro* de pacientes com artrite reumatóide e controles ao PPD, ao mitógeno Conavalina A e a provável *heat shock protein* de *Mycoplasma arthritis*, para avaliar o papel do MHC classe II na diminuição desta. Verificaram que os

pacientes apresentavam uma diminuição aos três estímulos, porém, não encontraram uma relação entre a apresentação dos antígenos pelo MHC classe II e a baixa resposta celular, uma vez que, a ConA não necessita da apresentação via MHC. KINGSLEY et al., 1987, verificaram que a resposta linfoproliferativa ao PPD em pacientes com artrite reumatóide era aumentada, mas não chegava a equiparar-se à dos controles, quando se adicionava rIL-2 às culturas, concluindo que a diminuição da resposta celular destes pacientes estava relacionada em parte a diminuição da secreção de IL-2. Porém, CORRIGAL et al., 1999, avaliando também o mecanismo envolvido na baixa resposta linfoproliferativa ao PPD dos pacientes com artrite reumatóide, verificaram que esta diminuição estava mais relacionada a proporção de IL-2:IL-10, do que à quantidade de IL-2 secretada pelos pacientes. Estudo mais recente de Ponchel et al., (2002), verificou alteração na diferenciação de células de memória em pacientes com artrite reumatóide. Esse estudo mostrou que linfócitos dos pacientes mantinham a expressão do marcador CD45RA (expresso por células naíves) mesmo após a aquisição do marcador CD45RO (adquirido após encontro com antígeno específico), formando uma população atípica duplo-positiva de células de memória. Além disso, os pacientes apresentavam uma outra população atípica de células de memória ($CD45RA^- CD45RO^- CD62L^+$). Assim, estas alterações da diferenciação celular poderiam resultar no comprometimento da resposta imune secundária verificada nos pacientes.

Não há semelhantes estudos com pacientes portadores de psoríase, e como esta se apresenta em graus distintos de gravidade, foi aventada a hipótese de que na psoríase grave haveria uma maior mobilização de linfócitos, que reconheceriam antígenos relacionados com a psoríase, para a pele, diminuindo assim a resposta

imune sistêmica aos demais antígenos. Para testar tal hipótese foi avaliada a resposta imune em um subgrupo de pacientes com psoríase leve a moderada não reatores a intradermoreação com PPD.

Em relação ao antígeno AgSMtb, os pacientes com psoríase leve a moderada mostraram uma resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ similar ao grupo controle, e superior a dos pacientes com psoríase grave. Já em relação ao Ag85B, os pacientes com psoríase leve a moderada apresentaram resposta linfoproliferativa equiparável aos pacientes com psoríase grave, e inferior ao grupo controle. A produção de IFN- γ dos pacientes com psoríase leve a moderada foi intermediária entre os controles e pacientes com psoríase grave. Estímulo com ESAT-6 mostrou que os pacientes com psoríase leve a moderada apresentaram o mesmo perfil de diminuição da linfoproliferação e produção de IFN- γ que os pacientes com psoríase grave quando comparados aos controles. Assim, os pacientes com psoríase leve a moderada apresentaram uma resposta imune aos antígenos de Mtb intermediária aos grupos de análise, mostrando que a diminuição da resposta estaria apenas, parcialmente ligada ao grau de gravidade da doença.

A avaliação dos efeitos do infliximab e etanercepte mostrou que, o infliximab é capaz de neutralizar totalmente o TNF- α , enquanto que, o etanercepte apenas parcialmente, sendo que, em alguns casos até levou ao aumento da produção da citocina. Estudo realizado *in vivo* com pacientes portadores de espondilite anquilosante mostrou que, após 12 semanas de tratamento com etanercepte houve aumento no número de linfócitos T positivos para TNF- α (Zou et al., 2003). Isto poderia explicar clinicamente o fato do infliximab ser mais eficaz no tratamento de psoríase grave do que o etanercepte (Smith et al., 2005).

A modulação realizada *in vitro* com os inibidores de TNF- α levou a uma diminuição da linfoproliferação frente aos antígenos micobacterianos. Dados semelhantes foram obtidos por Hamdi et al. (2006) ao adicionar *in vitro* os inibidores em cultura de linfócitos de pacientes com doenças inflamatórias crônicas (artrite reumatóide, doença de Crohn e espondilite anquilosante). Além disso, foi necessária a utilização de uma concentração quatro vezes mais elevada de etanercepte, em relação ao infliximab, para alcançar o mesmo grau de inibição. Apesar da diminuição da resposta linfoproliferativa, a adição dos inibidores não ocasionou alteração na secreção de IFN- γ . É reconhecido que o IFN- γ é uma citocina importante no desencadeamento de uma resposta imune celular efetora contra o Mtb (Tsuyuguchi, 1995), assim inicialmente esperávamos que, a retirada de TNF- α do sistema, levaria a uma diminuição da produção de IFN- γ o que explicaria a reativação dos focos quiescentes da infecção. Porém o mesmo não ocorreu, mostrando que a cadeia de eventos envolvidos na contenção de um microorganismo intracelular, como o Mtb, vai muito além da produção de um único tipo de citocina, e que o sinergismo que ocorre entre diferentes citocinas está envolvido no desencadeamento e manutenção da resposta imune celular.

Houve, entretanto uma inibição completa da secreção de IL-10. Esta observação não é surpreendente, uma vez que a secreção de IL-10 é regulada pela secreção de TNF- α . IL-10 é uma potente citocina antiinflamatória que inibe a produção de TNF- α pelos macrófagos, monócitos e neutrófilos. A presença de altos níveis sistêmicos de TNF- α causaria uma elevada produção de IL-10, que por sua vez, num mecanismo de feedback negativo, diminuiria a produção de TNF- α , com a aparente finalidade de controlar uma resposta inflamatória exacerbada e, portanto

deletéria ao hospedeiro (Sato et al., 2003; Pereira et al., 2003; Bolger et al., 2002). Essa diferença na inibição levantou a questão da diminuição da produção de IL-10 induzida pelo efeito do etanercepte, pois se TNF-a interfere na produção de IL-10, como poderíamos explicar a inibição da secreção de IL-10 na presença de etanercepte, sendo que na presença deste a secreção de TNF-a se manteve inalterada ou até aumentada. Desde que a secreção de ambas está intrinsecamente relacionada, se há inibição de IL-10 deveria haver também inibição de TNF-a. Uma hipótese aventada por nós é de que o etanercepte (proteína que mimetiza o receptor de TNF-a) ao se ligar ao TNF-a bloqueie sua atividade biológica, da mesma forma que o infliximab, o que impediria a indução da secreção de IL-10 por esta citocina. Entretanto a ligação do etanercepte com TNF-a, diferentemente da ligação com infliximab, não comprometeria sua atividade antigênica, i.é., a molécula continuaria sendo capturada por seu anticorpo na reação de ELISA.

A modulação da resposta com infliximab e etanercepte não promoveu diminuição do número de células produtoras de IFN- γ (i.é., quantificadas por ELISPOT). A ausência de interferência na resposta por parte dos inibidores, como já discutido, possa ser explicada pelo fato de estarmos quantificando células de memória efetora, as quais já estariam diferenciadas e aptas para exercer sua resposta efetora rapidamente após entrar em contato com o antígeno. Portanto a resposta imune desencadeada por estas células dispensaria etapas necessárias às células naíves, para que estas possam efetuar suas funções, não sofrendo assim influência pela modulação realizada com os inibidores de TNF-a. Estas observações poderiam ser a razão pela qual apenas uma porcentagem relativamente pequena dos pacientes que fazem uso deste tipo de medicação sofre reativação da Tb, pois as células de

memória efetora responsáveis pela “vigilância” anti-tuberculose não seriam afetadas ao longo do tratamento. Estudo realizado por Wallis e colaboradores (2004) em pacientes nos EUA que fizeram uso dos inibidores infliximab e etanercepte mostrou que a proporção de casos de reativação de tuberculose entre os pacientes que utilizaram infliximab foi de 106/100, 000 e de 32/100, 00 entre os que usaram etanercepte. Apesar desta significativa elevação em relação à incidência anual nos EUA, que é de 5 casos/100,000 pessoas-ano, e que nos levou a pesquisar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) neste evento, este estudo também evidencia que a porcentagem dos pacientes que apresentam reativação durante o uso da terapêutica com os agentes biológicos infliximab e etanercepte da tuberculose é ainda relativamente baixa.

9. CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem concluir que os pacientes com psoríase grave PPD (-) apresentam uma baixa reatividade *in vitro*, principalmente das respostas que avaliam linfócitos T de memória central, aos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que essa baixa reatividade não está totalmente relacionada com a gravidade da doença, uma vez que os pacientes com psoríase leve a moderada apresentaram resposta intermediária à dos controles e pacientes com psoríase grave. Em relação ao efeito dos inibidores de TNF- α , concluímos que os agentes anti-TNF- α causam uma diminuição da resposta linfoproliferativa, tanto com o estímulo por mitógeno quanto com os antígenos micobacterianos, porém, sem haver diminuição de secreção de IFN- γ . A modulação da resposta imune com infliximab e etanercepte não promoveu diminuição de células produtoras de IFN- γ quantificadas por ELISPOT. Assim, apesar dos inibidores de TNF- α promoverem uma inibição parcial da resposta imune, a reativação da tuberculose estaria mais relacionada à própria ausência de TNF- α , não compensada pela atuação isolada, e provavelmente insuficiente, de IFN- γ na manutenção do granuloma, do que a outras substanciais modificações na resposta imunológica frente aos antígenos micobacterianos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, Palou EC, van Soolingen D, Ottenhoff THM, van Dissel JT. Tuberculin Skin Testing and in vitro Tcell responses to ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 after with Mycobacterium marinum or M. Kansasii. *J Infec Dis.* 2002; 186:1797-1807.

Azulay-Abulafia A, Gripp A. *Anexo 10: Imunobiológicos na Psoríase. In: Consenso Brasileiro de Psoríase – Guias de Tratamento. Ed. Sociedade Brasileira de Dermatologia* 2006.

Bay ML, Lehrer A, Bressanelli A, Morini J, Botasso O, Stanford J. Psoriasis patients have T-cells with reduced responsiveness to common mycobacterial antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 21(1): 65-70.

Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1717-25.

Bennekov T, Dietrich J, Rosenkrands I, Stryhn A, Doherty TM, Andersen P. Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine-induced protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2006; 36(12):3346-55.

Bentley-Hibbert, SL; Quan, X; Newman, T; Huygen, K; Godfrey, HP. Pathophysiology of Antigen 85 in patients with active tuberculosis: Antigen 85 Circulates as Complexes with Fibronectin and Immunoglobulin G. *Infect and Immun.* 1999; 67 (2): 581-88.

Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun.* 2000; 68(12):6954-61.

Berg L, Rönnelid J, Klareskog L, Bucht A. Down-regulation of the T cell receptor CD3 zeta chain in rheumatoid arthritis (RA) and its influence on T cell responsiveness. *Clin Exp Immunol.* 2000; 120(1):174-82.

Bolger AP, Sharma R, von Haeling S, Doehner W, Oliver B, Rauchhaus M, Coats AJS, Adcock M, Anker S. Effect of IL-10 on the production of TNF α by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2002; 90:384-89.

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.

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn JL, Bloom BR. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995; 63:736-40.

Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H, Reece WH, Mwinga A, Godfrey-Faussett P, Lalvani A. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS* 2002; 16(17):2285-93.

Christophers E, Mrowietz U. *Psoriasis in: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicina*. 5a ed. 1999; 1: 495-521.

Corrigall VM, Garyfallos A, Panayi GS. The relative proportions of secreted interleukin-2 and interleukin-10 determine the magnitude of rheumatoid arthritis T-cell proliferation to the recall antigen tuberculin purified protein derivative. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(12):1203-7.

Dietrich J, Weldingh K, Andersen P. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. *Vet Microbiol*. 2006; 112:163-69.

Emery P, Panayi GS, Welsh KI, Cole BC. Relationship of HLA-DR4 to defective cellular immunity in rheumatoid arthritis using PPD, and mycoplasma and lectin mitogens. *J Rheumatol*. 1985; 12(5):859-64.

Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002 ;2(5):364-71.

Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 2004; 84:93-101.

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; 3:148-55.

Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 54: S67-80.

Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:2122-27.

Grover A, Ahmed MF, Singh B, Verma I, Sharma P, Khuller GK. A multivalent combination of experimental antituberculosis DNA vaccines based on Ag85B and regions of difference antigens. *Microbes Infect.* 2006; 8(9-10):2390-99.

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.

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.

Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1996; 64:16-22.

Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol.* 1985; 13:450–56.

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.

Huebner RE, Schein MF, Bass JBJr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993; 17: 968-75.

Janeway C, Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology*. 7a ed. Nova Iorque: Garland Science, Taylor & Francis group; 2008. p. 741-3; p. 763-5.

Jeffries DJ, Hill PC, Lugos M, Jackson-Sillah, Adegbola RA, Brookes RH. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the Gambia. *Int J Tuber Lung Dis*. 2006; 10(2):192-198.

Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, Ghrayeb J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*. 1993;20:1443-53.

Kingsley GH, Pitzalis C, Panayi GS. Abnormal lymphocyte reactivity to self-major histocompatibility antigens in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1987; 14(4):667-73.

Krueger JG & Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann. Rheum. Dis*. 2005; 64:30-36.

Krueger GG, Callis KP. Development and use of alefacept to treat psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 49: S87-S97.

Krueger GG, Feldman SR, Camisa C, Duvic M, Elder JT, Gottlieb AB, Koo J, Krueger JG, Lebwohl M, Lowe N, Menter A, Morison WL, Prystowsky JH, Shupack JL, Taylor JR, Weinstein GD, Barton TL, Rolstad T, Day M. Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: what defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43:281-5.

Ladel CH, Szala YG. , Reidel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* – infected macrophages. *Infect Immun.* 1997; 65: 1936-38.

Lalvani A, Pathan A A, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WHH, Latif M, Pasvol G, Hill AVS. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001; 357(9273): 2017-21.

Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia 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.

Langermans Jam, Doherty TM, Vervenne RAW, Van Der Laan T, Lyashchenko K, Greenwald R, Agger EM, Weiler CA, Weiler H, Van Soolingen D, Dalemans W,

Thomas AW, Andersen T, Andersen P. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* 2005; 23(21): 2740-50.

Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet* 2003; 361:1197-1204.

Lebwohl M, Ali S. Treatment of psoriasis. Part 1 . Topical therapy and phototherapy. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:487–98.

Lebwohl M, Ali S. Treatment of psoriasis. Part 2. Systemic therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2001a ; 45:649–61.

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.

Long R, Gardam M. Tumor necrosis factor-alpha inhibitors and the reactivation of latent tuberculosis infection. *CMAJ* 2003;168:1153-56.

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; 356:385-90.

Mendonça M, Tanji MM, Silva LCR, Silveira GG, Oliveira SC, Duarte AJ, Benard G. Deficient in vitro anti-mycobacterial immunity despite successful long-term highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients with past history of tuberculosis infection or disease. *Clin Immunol*. 2007; 125(1): 60-6.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). *Tuberculose: Guia de vigilância epidemiológica*. 1ª ed. Elaborado pelo comitê Técnico-Científico de assessoramento à Tuberculose e Comitê assessor para co-infecção HIV-Tuberculose e colaboradores – Brasília – DF, 2002.

National Psoriasis Foundation. Facts: Psoriasis, 2008. Available from <http://www.psoriasis.org/facts/psoriasis>

Orme I. Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7:58-61.

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.

Pai M, Riley IW, Colford JMJ. Interferon-assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:761-6.

Pereira, CB.; Palaci, M; Leite, OH M.; Duarte, AJS.; Benard, G. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected

subjects and correlaters with clinical manifestations. *Microbes and Infec.* 2003; 6: 25-33.

Ponchel F, Morgan AW, Bingham SJ, Quinn M, Buch M, Verburg RJ, Henwood J, Douglas SH, Masurel A, Conaghan P, Gesinde M, Taylor J, Markham AF, Emery P, van Laar JM, Isaacs JD. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood* 2002; 100(13): 4550-6.

Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004; 120:213-32.

Ravn P, Demissie A, Eguale T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA, Mustafa AS, Jensen AK, Holm A, Rosenkrands I, Oftung F, Olobo J, Von Reyn F, Andersen P. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1999, v.179, p.637-45.

Rocha KC. *Avaliação da resposta linfoproliferativa e da fenotipagem leucocitária de pacientes HIV soro negativos com neurocriptococose.* Tese, Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Rose, NR; Friedman, H; Fahey, JL. *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3a ed. Washington, DC: Editora American Society for Microbiology, 1986. p. 274-80.

Sato TA, Jeffrey AK, Mitchell MD. Critical paracrine interactions between TNF α and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulated human choriodecidual cytokine and prostaglandin E2 production. *J Immun.* 2003; 170:158-66.

Schottelius AJG, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards III CK. Biology of tumor necrosis factor- α – implications for psoriasis. *Exp. Dermatol.* 2004; 13:193-222.

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; 42:829-31.

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 2005. *Br J Dermatol.* 2005; 153(3):486-97.

Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerrett SJ, Wilson CB. Local role for tumor necrosis factor α in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2002; 70(4): 2082-9.

Souza TNL. *Avaliação da prevalência da infecção por Mycobacterium tuberculosis entre os profissionais de saúde do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.* São Paulo, 1999. Dissertação (Mestrado) –

Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Tanji, MM. *Resposta immune celular a diferentes antígenos micobacterianos em indivíduos infectados por Mycobacterium tuberculosis:avaliação por ELISPOT, ELISA e linfoproliferação.* Tese, Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.

Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* 1993; 14 (7): 335-38.

Tsuyuguchi I. Immunology of tuberculosis and cytokines. *Kekkaku* 1995; 70(5): 335-46.

Tzu J, Kerdel F. From conventional to cutting edge: the new era of biologics in treatment of psoriasis.*Dermatol Ther.* 2008; 21(2):131-41.

Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CMS, Chimara E, Ferrazoli L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab.* 2005; 41:1-8.

Vekemans J, Lienhardt C, Sillah JS, Wheeler JG, Lahai GP, Doherty MT, Corrah T, Andersen P, McAdam KP, Marchant A. Tuberculosis contacts but not patients have

higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. *Infect Immun*. 2001;69:6554-57.

Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2002; 1:264-75.

Victor FC, Gottlieb AB, Menter A. Changing paradigms in dermatology: tumor necrosis factor alpha (TNFa) blockade in psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Dermatol*. 2003; 21:392-397.

Wallis R S, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infec Dis*. 2004; 38:1261-65.

Whittam LR, McGibbon DH. The management of psoriasis. *Int J Clin Pract*. 1998; 52:487-91.

Wong M, Ziring D, Korin Y, Desai S, Kim S, Lin J, Gjertson D, Braun J, Reed E, Singh RR. TNF alpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol*. 2007; 126(2):121-36.

World Health Organization. 2006. Data and statistics. Available from: <http://www.who.org>.

Zou J., Rudwaleit M., Brandt J., Thiel A., Braun J., Sieper J. Up regulation of the production of tumor necrosis factor α and interferon γ by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 561-64.

APÊNDICES

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.09.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **830/05**, intitulado: "**Avaliação do efeito do bloqueio de Fator de Necrose Tumoral (TNF) na reposta imune anti-*Mycobacterium tuberculosis in vitro* em pacientes com psoríase moderada à grave**" apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Denise F. Takahashi**

Pesquisador (a) Executante: **Léia Rodrigues**

Gil Benard

Marcelo Arnone

CAPPesq, 29 de Setembro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ? F ?

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ? F ?

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (...)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Avaliação do efeito do bloqueio de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) na resposta imune *in vitro* aos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com psoríase

2. Pesquisador: Maria Denise Fonseca Takahashi

CARGO/FUNÇÃO: médica dermatologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 17065

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da FM-USP-SP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ?

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO?

RISCO BAIXO ?

RISCO MAIOR ?

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : dois anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Tentar esclarecer porque os pacientes que fazem uso de terapias biológicas, por exemplo infliximab e etanercept, estão mais sujeitos a reativação de tuberculose.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa serão experimentos laboratoriais no campo da imunologia (análise da resposta imune de memória via linfoproliferação e secreção de citocinas) a partir de amostras de sangue periférico coletadas dos pacientes.

3. desconfortos e riscos esperados

O único desconforto é a coleta de sangue a partir de veia periférica (normalmente não será necessária uma coleta específica; a obtenção do material será programada para ocorrer juntamente com a coleta de exames de rotina).

4. benefícios que poderão ser obtidos

Futuramente saber quais os pacientes que realmente têm o potencial de desenvolver tuberculose quando submetidos à terapia com agentes biológicos como infliximab e etanercept.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não se aplicam

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

A coleta de sangue será realizada de preferência no dia da consulta.

Orientações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer dúvidas serão dadas a qualquer momento.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

A participação no estudo é livre e a qualquer momento poderá ser retirado seu consentimento sem que isto traga prejuízo à continuidade de seu tratamento.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Os resultados obtidos dos testes laboratoriais serão mantidos em confidencialidade

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

A assistência no HCFMUSP está disponível para danos relacionados à coleta de exames/ à saúde decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Como se trata de projeto com risco mínimo, não há previsão de indenização

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Maria Denise Fonseca Takahashi, Departamento de Dermatologia, fone 30884894

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)