Maury Massani Tanji

Resposta imune celular a diferentes antígenos micobacterianos em indivíduos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*: avaliação por elispot, elisa e linfoproliferação

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo
2004

Dedico este trabalho:

À minha esposa Marcia e ao meu filho Thiago
Pelo carinho, apoio e compreensão dos poucos momentos em que estive
presente nestes últimos meses.

Aos Meus Pais
Masao e Marina, por sentir sua presença, em energia, sempre constante

À Minha mãe de coração Yoshi e meu irmão de luz Massanori Tomioka

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Gil Benard, por sua amizade, orientação, apoio técnico, teórico e moral, e por ter sido responsável direto na elaboração e término deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto J. S. Duarte, por seu apoio e pelas oportunidades que tem me proporcionado, ao longo dos últimos vinte e poucos anos (desde janeiro de 1983).

Ao Dr. Marcelo Mendonça, pela amizade, pela parceria nestes dois últimos anos, aprendendo juntos, por conseguir os pacientes para o trabalho e o auxílio importante na fase final do trabalho.

À Prof. Dra. Maria Notomi Sato por sua amizade de longa data, o apoio e o incentivo e sugestões na qualificação, sem o qual não teria conseguido finalizar o trabalho.

Ao Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos apoio e suas sugestões que sempre foram importantes, inclusive na qualificação.

Ao Prof. Dr. Jorge Casseb e Profa. Dra. Anete Sevciovic Grumach pelas palavras de apoio e incentivo na continuidade do trabalho.

Ao Dr. Michelângelo Juvenale e Dr. Maurício Ferreira, apoio e convivência nos finais de semana e as noites durante a fase final dos nossos trabalhos.

À Dra. Heidi Baida, Dra. Carla Romano, Dra. Camila Cáceres, pessoal do grupo, pela preocupação com o andamento e sugestões para a evolução do trabalho.

À Dra. Noemia Mie Orii, por sua amizade, incentivo e como sempre muito prestativa, ao emprestar o contador de células.

À Bióloga Soraya Ogusugu (minha ex-aluna) por se mostrar sempre disposta a me ajudar, fazendo com que eu não esquecesse as culturas.

À Sirlene Porfírio Quirola por sua amizade, apoio e palavras de incentivo durante todo o desenvolvimento do trabalho e por me mostrar concretamente que vale a pena lutar pelos objetivos.

Ao Dr. Jorge Miyashiro, que me incentiva a continuar lutando, por mostrar sua força de vontade em sempre estar querendo aprender e sua dedicação ao trabalho.

À Dra. Edite H. Yamahiro Kanashiro pela amizade de muitos anos, apoio e incentivo sempre constante.

À Profa. Débora Regina Bocatto por sua amizade e constante incentivo nos últimos anos.

À Dra Celina da Cunha por sua amizade apoio constante, e sempre se oferecendo para auxiliar no desenvolvimento do trabalho.

À Meire Navickas Constantino pela amizade, apoio técnico que muito me ajudou.

À Marly, minha irmã, e ao Augusto pelo apoio, e auxílio nos momentos de necessidade.

À Dra. Simone Fonseca, Adriana Coutinho e Cristiano Bosco pelo apoio técnico e auxílio na manipulação do equipamento de Elispot

À Dra Patrícia Furtado do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Recife), conheço apenas por e-mail, mas que auxiliou muito na leitura de algumas placas de IL-10.

A todos do Laboratório, por proporcionar uma convivência sempre agradável e que muitas vezes me auxiliaram, resolvendo os meus pequenos problemas de ordem “técnica”: Shirley Komninakis, Patrícia Montanheiro, Dr Alexandre Almeida, Lígia Ichimura, Simone Cardoso Castagnaro, Rosângela Maria Araújo, Ana Elisa Fusaro Bortoloto, Célia Regina de Oliveira, Cyro Alves de Brito, Eliana Akemi Futata Taniguchi, Jefferson Russo Victor, Rachel Guedes da Silva, Francinelson Duarte Lourenço, Chang Dong Kim. Viviane Yoshimi Nojima, Adriana Brito, Patrícia Novoa, Ingrid Olah do Nascimento, Eliazib Sales Bueno, Tatiana Negri Santi, Kélem de Nardi Chagas, Andréa Barretta, Cinthia Pinhal, Valéria Ferrari, Fabíola Frias, Anna Christina D’ambrósio, Edna Regina dos Reis, Karla Regina M. Ronchini, Cláudia Cortese Barreto, Fábio Eduardo Santos da Silva, Pula Ordonhez Rigatto, Rosana Alcalde, Rosa Maria Ramos Stellin, Valéria Brito Oliveira, Wagner Milanello, Olivete Ribeiro Venâncio, Adriana Rocha dos Santos Santana, Celeste da Conceição da Cruz Romano, Clarice Oliveira dos Santos, Daniel Tapias Morales, Cleiton Alves, Gustavo Pereira Schiavinato Rodrigues, Lúcio Martins, Luiz Carlos Abrahão, Odair Anna Merli, Paulo Roberto Rocha Lanzieri, Priscila Francisca Maria Araújo e Eduardo do Couto Rabelo Reis e ao Daniel.

E a todos que não estão nesta lista mas fazem parte do laboratório, muito obrigado por tudo.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído.

E em especial aos pacientes e controles que participaram deste trabalho, sem eles, a ciência não evoluiria. Muito Obrigado.

A Deus eu nunca canso de agradecer, pois é com a energia dele que conseguimos sobreviver.

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic granulomatous disease characterized by a deficit of the antigen-specific immunity of the host, whose immune response is actively regulated by cytokines. In Brazil there are 50 million people infected with *Mycobacterium tuberculosis*. The objective of the present work was to evaluate the lymphoproliferative response and the IFN- γ response by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) induced with 4 different antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis*: a complex, crude, the sonicate antigen, and 3 other, purified ones, Esat-6, 85B, and HBHA, the last 3 eventual candidates to the design of a vaccine against tuberculosis. We used 2 methods to evaluate the IFN- γ and IL-10 productions, namely Elispot and Elisa of supernatant of PBMC cultures. We studied a group of active tuberculosis patients (TB-A), and compared them with controls individuals comprising 2 groups, one made of healthy PPD+ individuals and the second one of individuals who have been cured from an episode of tuberculosis in the past (TB-C). Our results of lymphoproliferation and Elisa revealed decrease in the lymphoproliferative and IFN- γ responses by patients' PBMC as compared to the PPD+ group, with the TB-C group in general presenting intermediate results. We also observed that the responses to the mitogen PHA were not statistically different among the groups, denoting the antigen-specific nature of the immune deficit in tuberculosis. In addition, we verified that stronger reactivity to the complex antigen than with the purified antigens, and, among the latter, the reactivity was stronger with Esat-6 and 85B as compared to HBHA. Reactivity to HBHA may have been underestimated due to technical reasons, such as loss of the biological activity of the molecule or use of a sub-optimal dose. By using the Elispot for IFN- γ we were not able to detect differences among the groups, even when we counted all spots formed or spots with more than $> 65 \mu\text{m}$ in diameter. Thus our Elispot for IFN- γ apparently showed lower sensitivity than the other 2 methods. Furthermore, comparisons between the methods revealed low correlation between their results, a finding that may be explained by the differing contribution of different subpopulations (T CD4+ and T CD8+) to each of the results. Finally, analysis of the production of IL-10 as measured by Elisa in the culture supernatants as well as by Elispot revealed no differences among the groups. It is noteworthy that the levels of IL-10 detected by Elisa were low, but the Elispot revealed high number of spots and a good correlation between the antigen responses. In conclusion, we may say that our well standardized "classical" methods Elisa and lymphoproliferation persist useful to evaluate cellular immunity responses, and that the Elispot technique, up to now and in our laboratorial conditions, did not represent an improvement in the quality of the immunological evaluation.

RESUMO

A tuberculose é uma doença crônica granulomatosa caracterizada por um déficit de imunidade antígeno específica do hospedeiro, cuja resposta imune é ativamente regulada por citocinas. No Brasil há mais de 50 milhões de habitantes infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O objetivo foi avaliar a linfoproliferação e a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas por quatro diferentes antígenos do *M. tuberculosis*, um complexo, o antígeno sonicado, e três purificados, ESAT-6, antígeno 85B e antígeno HBHA, eventuais candidatos à vacina anti-tuberculose. Para avaliação da produção de IFN- γ e IL-10 foram utilizados dois métodos: Elispot e Elisa à partir de sobrenadante de cultura de PBMC. Para essas avaliações, os pacientes com tuberculose ativa (TB-A) foram comparados a dois subgrupos de indivíduos controles. O primeiro subgrupo foi constituído por indivíduos saudáveis PPD+ e o segundo por indivíduos curados de um episódio de tuberculose (TB-C). Nossos resultados de linfoproliferação e de Elisa revelaram diminuição da resposta linfoproliferativa e da produção de IFN- γ dos pacientes em comparação com os indivíduos PPD+, enquanto os indivíduos TB-C apresentaram em geral resultados intermediários. Observou-se também que as respostas à PHA não diferiam significativamente entre os grupos, ressaltando a natureza antígeno específica da hiporreatividade na tuberculose. Adicionalmente, verificamos maior reatividade ao antígeno complexo, sonicado, que aos antígenos purificados, e entre estes, a reatividade foi maior para ESAT-6 e 85B que para HBHA. A resposta ao HBHA pode ter sido eventualmente subestimada por razões técnicas, como utilização de dose sub-ótima ou perda da atividade biológica. Em relação ao Elispot para IFN- γ , não pudemos observar diferenças entre os grupos, tanto quando se considerou o número total de *spots*, como quando se contou apenas *spots* com diâmetro > 65 μ m, apresentando portanto uma sensibilidade aparentemente menor comparado aos outros 2 métodos. A comparação entre os métodos revelou pouca correlação entre seus resultados, o que pode ser eventualmente explicado pela diferente contribuição das populações celulares (T CD4+ e T CD8+) para cada uma das provas imunológicas. Finalmente, a análise da produção de IL-10 medida por Elisa no sobrenadante de cultura e por *spots* de IL10, também não revelou diferenças entre os grupos. Convém notar que o Elisa detectou baixas concentrações de IL-10 nos sobrenadantes, porém o Elispot demonstrou número elevado de *spots* e boa correlação entre as resposta aos antígenos. Em conclusão, nossos resultados sugerem que métodos “clássicos”, e já estabelecidos, como linfoproliferação e Elisa, persistem válidos para se avaliar a imunidade celular, e que em nossas condições laboratoriais, a técnica de Elispot não representou, até o momento, uma melhora na qualidade da avaliação imunológica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	14
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
3.1. Casuística.....	15
3.1.1. Pacientes.....	15
3.2. Material e Métodos.....	16
3.2.1. Antígenos e Mitógenos.....	16
3.2.2. Elispot	17
3.2.3. Separação de Células Mononucleares.....	18
3.2.4. Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico para Ensaio de Linfoproliferação e Secreção de Citocinas.....	18
3.2.5. Quantificação de Células Formadoras de Spots (CFS) para IFN- γ por Elispot	19
3.2.6. Determinação de Células Produtoras de IL-10 por Elispot	21
3.2.7. Determinação da Produção de IL-10 e IFN- γ em Sobrenadantes de Culturas de PBMC por Elisa.....	22
3.3. Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Avaliação da Resposta Linfoproliferativa por Índice de Estimulação e 3 Hcpm e Produção de IFN- γ por Elisa.....	25
4.1.1. Proliferação Espontânea.....	25
4.1.2. Resposta ao Mitógeno Fitohemaglutinina (PHA).....	26
4.1.3. Resposta ao Antígeno Sonicado.....	27
4.1.4. Resposta ao Antígeno ESAT-6.....	29
4.1.5. Resposta ao Antígeno 85B.....	31

4.1.6. Resposta ao Antígeno HBHA.....	33
4.2. Correlação entre os Resultados de Elisa e Linfoproliferação.....	34
4.2.1. Antígeno Sonicado.....	34
4.2.2. Antígenos ESAT-6.....	35
4.2.3. Antígeno 85B.....	36
4.2.4. Antígeno HBHA.....	37
4.3. Uso do Mitógeno PHA e Antígenos de <i>M.tuberculosis</i> (MTB) como estímulo às Células Formadoras de Spots	38
4.3.1. Valores Espontâneos.....	38
4.3.2. Resposta ao Mitógeno PHA.....	39
4.3.3. Resposta ao Antígeno Sonicado.....	40
4.3.3.1. Análise de CFS com Spots Totais.....	40
4.3.3.2. Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65µm.....	40
4.3.4. Resultados da Resposta ao Antígeno ESAT-6.....	41
4.3.4.1. Análise de CFS com Spots Totais.....	41
4.3.4.2. Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65µm.....	42
4.3.5. Resultados da Resposta ao Antígeno 85B.....	42
4.3.5.1. Análise de CFS com Spots Totais.....	42
4.3.5.2. Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65µm.....	43
4.3.6. Resultados da Resposta ao Antígeno HBHA.....	43
4.3.6.1. Análise de CFS com Spots Totais.....	43
4.3.6.2. Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65µm.....	44
4.4. Análise da Correlação dos Resultados do Elispot e do Elisa na Avaliação da produção de IFN-γ e Linfoproliferação.....	44
4.4.1. Antígeno Sonicado.....	44
4.4.2. Antígeno ESAT-6.....	46
4.4.3. Antígeno 85B.....	47
4.4.4. Antígeno HBHA.....	48
4.5. Correlação entre as Respostas aos Antígenos de MTB de Acordo com o Método Empregado.....	48
4.5.1. Elisa para IFN-γ.....	48

4.5.2. Linfoproliferação por Índice de Estimulação.....	50
4.5.3. Linfoproliferação por ?cpm.....	52
4.5.4. Elispot para IFN- γ (Spots Totais).....	53
4.5.5. Elispot para IFN- γ com Spots de Diâmetro Superior a 65 μ m.....	54
4.6. Produção de IL-10 após estímulo com o Mitógeno PHA e Antígenos de MTB.....	56
4.6.1. Análise por Elisa.....	56
4.6.1.1. Análise da Proliferação Espontânea de IL-10 por Elisa.....	56
4.6.1.2. Análise da Produção de IL-10 frente aos Antígenos de MTB... por Elisa.....	57
4.6.2. Análise por Elispot.....	58
4.6.2.1. Análise da Produção Espontânea de IL-10 por Elispot.....	58
4.6.2.2. Análise da Produção de IL-10 frente aos Antígenos Específicos por Elispot.....	58
4.6.3. Correlação entre os Números de CFS para IL-10, por Elispot, na Resposta aos Antígenos de MTB nos Grupos Estudados	59
4.6.3.1. Grupo PPD+.....	59
4.6.3.2. Grupo TB-A	60
4.6.3.3. Grupo TB-C.....	61
 5. DISCUSSÃO.....	 63
 6. CONCLUSÃO.....	 78
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 79

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que provavelmente sempre acometeu o ser humano, pois em esqueletos humanos com cerca de 10.000 anos encontrados na Alemanha, havia evidências de TB óssea. No oriente, há descrições de uma doença pulmonar muito semelhante à TB (China e Índia antigas). Na antiga Grécia, Hipócrates reconheceu ser uma doença física natural e não obra de castigo divino como se pensava, foi além e a chamou de tísica (do grego *phthisikos* : “ que traz consumpção”) por causa da debilidade física que provoca no indivíduo acometido, consumindo-lhe as forças. Os romanos bem conheciam a tísica, isso é comprovado em artigos escritos por Plínio (O Velho) , por Galeno e por Areteu da Capadócia (na época Do imperador Nero). Nessa época já se sabia dos hábitos dos tísicos, do benefício do repouso e clima saudável e até sugeriam tratamentos para os sintomas. Os árabes, também já estudavam a Tuberculose nas suas escolas de medicina. (KRITSKI, 2000)

Certamente à medida que os povos foram crescendo, deixando de ser nômades e vivendo em cidades cada vez mais aglomeradas, isso pela necessidade de proteção que tinham de viver mais e mais organizados por causa de outros povos conquistadores, foi aumentando a presença da TB como causa de doença e morte, pois ela se dissemina pelo contato pessoa a pessoa e por via aérea, assim áreas fechadas facilitam o contágio. Imaginemos como era mais fácil para os bacilos da TB se espalharem naqueles teatros gregos e romanos com milhares de pessoas juntas (até 15.000 como no famoso teatro grego Epidauros- 350 a . C; e 40.000 nos circos romanos); nas casas sem janelas e edificadas com várias famílias em Roma (séc. II a C) e depois nos muitos locais de suas conquistas(e a de outros povos), geralmente arrasados pelas guerras; depois com a Revolução Industrial (final do

séc. XVIII) o modo de vida cada vez mais urbano e concentrado em cidades com suas fábricas, facilitavam ainda mais as condições de disseminação da TB.

Desde os séculos XIV e XV, na Europa (região que hoje é a Itália) os médicos tentavam isolar os pacientes e seus pertences como uma forma de evitar o contágio, prova de que já desconfiavam que a doença se espalhava entre pessoas. No século XVI, época das grandes navegações, aconteceu um fato histórico chamado “Toque do Rei” foi descrito por historiadores: os pacientes portadores de TB ganglionar iam uma vez por ano até os palácios da França e Inglaterra para que o rei os tocassem num ritual com orações do próprio rei ou de seus cardeais. Não se sabe o porquê, mas fato era que realmente havia muitos casos de melhora, talvez pela higienização prévia que faziam antes de serem tocados pela majestade. Esse mito se estendeu até o final do século XVIII. Com os estudos de anatomia dos séculos XVII e XVIII e achados de estruturas com formato de tubérculos, sobretudo nos pulmões de cadáveres, surgiu o atual nome da doença: Tuberculose. Seu agente etiológico somente foi identificado por Robert Koch em 1882, que ficou conhecido desde então como "Bacilo de Koch" ou "BK" (KRITSKI, 2000).

Embora várias micobactérias possam causar doença pulmonar, podemos considerar que no ser humano, o agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (MTb), pertencente a ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (SUCCI, 1990 & KRITSKI, 2000).

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo delgado, não formador de esporos, sem flagelos, não produtor de toxinas, aeróbico obrigatório, que cresce lentamente. As micobactérias são relativamente resistentes aos procedimentos convencionais de coloração e quando coradas com carbol-fucsina não podem ser descoradas com ácido ou álcool, e assim, são classificadas como bacilos álcool-ácido resistentes.

Esta característica reflete a composição incomum da parede celular, que contém grandes quantidades de lipídeos, que podem ser responsáveis pela resistência da micobactéria a estresses ambientais, como o ressecamento (TORTORA, 2000). Todas as micobactérias expressam um único glicolípido no envelope celular, que é chamado lipoarabinomannan, que é um fator de virulência em potencial que pode ser liberado no local da infecção e ligar-se aos leucócitos modulando a resposta imune (STRONMEIER, G.R. & FENTON, M. J., 2000).

Devido a alta mortalidade por Tuberculose na França no início do século XX, em 1904 dois pesquisadores, Albert Calmette (bacteriologista) e Camille Guérin (veterinária) começaram a trabalhar no desenvolvimento de uma vacina, utilizando cepas atenuadas do *Mycobacterium bovis*, que mais tarde passou a se chamar Bacilo Calmette-Guérin (BCG), e que, com o avanço dos estudos, mostrou ser efetiva por volta de 1915 (WITTES, 2000).

A vacinação pelo BCG induz uma resposta imune celular que se associa ao controle da infecção porém não à erradicação da bactéria (YOUNG, 2001) e está significativamente associada com a redução de incidência de formas pulmonares e extra-pulmonares da Tuberculose (BREWER, 2000).

A Tuberculose atualmente acomete principalmente a população de países das regiões menos favorecidas economicamente (BEIGELMAN, et al., 2000).

Estima-se que uma pessoa bacilífera pode infectar de 10 a 15 pessoas por ano na comunidade com a qual tem contato. O risco de contágio de contactantes próximos é de 5% a 20%, e de contactantes casuais de 0,2% a 2% (KRITSKI, 2000).

Por esse motivo, a doença possui um caráter pandêmico e estima-se que por volta de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo estejam com infecção latente (PATHAN et al., 2000 & WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002) e em decorrência disto, cerca de 5 a 10%

desenvolverão tuberculose em algum período de suas vidas (LALVANI et al., 2001).

A OMS estima que o Brasil seja o 15º país do mundo em incidência da doença. Há uma estimativa de incidência de 68/100.000 habitantes, no entanto, o coeficiente de incidência notificado foi de 48,4/100.000 habitantes, sendo a região sudeste aquela com o maior número de casos notificados: 55/100.000 habitantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Baseado nesses dados, considera-se que no Brasil há cerca de 50 milhões de pessoas infectadas, com 130.000 novos casos a cada ano e 6.000 óbitos decorrentes (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA, 2002).

Para compreendermos melhor a relação entre tuberculose e redução de resposta imune precisamos antes compreender as etapas da resposta normal à *M. tuberculosis* :

-A resposta celular ao *M.tuberculosis* é induzida por constituintes da parede celular, principalmente o fator corda, que ativa linfócitos T e macrófagos, induzindo uma resposta granulomatosa;

-HICKMAN et al. (2002) demonstraram que após a fagocitose dos bacilos nos alvéolos, as células dendríticas (as melhores células apresentadoras de antígenos) e os macrófagos alveolares apresentam antígenos micobacterianos aos linfócitos T CD4. Essas células apresentadoras possuem grande expressão de moléculas do MHC em sua superfície e são grandes produtoras de IL-12 na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*;

- Os linfócitos ativados pela IL-12, passam a polarizar a resposta para Th1 com a produção de IL-2 que ativa as células citotóxicas e a liberação de IFN- γ , a citocina mais

importante desta resposta, responsável pela ativação macrofágica (com aumento da fagocitose), pela formação de granulomas e na produção de óxido nítrico (NO) com intenso poder micobactericida (TSUYUGUCHI, 1995);

- As micobactérias são destruídas nos macrófagos pelo óxido nítrico (YAMADA et al., 2000), uma molécula gasosa com inúmeras funções fisiológicas (LANE & GROSS, 2002) e pelas granulinas dos CTL e células NK (KRENSKY, 2000);
- Através da imunidade celular, cuja hipersensibilidade desenvolve-se normalmente após 2 a 10 semanas, a replicação das micobactérias é inibida tanto nos focos iniciais quanto nos focos metastáticos pela formação dos granulomas, com os bacilos albergando o interior de células epitelióides. Por este motivo em cerca de 90% dos casos a primo-infecção passa despercebida (FREIRE, 1989);
- A presença da hipersensibilidade tuberculínica parece proteger o indivíduo da reativação da doença a partir dos granulomas e da reinfecção exógena apenas quando este for exposto a um pequeno número de partículas infectantes (KRITSKI, 2000);
- A resistência do hospedeiro irá então determinar se a infecção ficará latente, com os bacilos não se multiplicando no interior das células (Tuberculose-infecção) ou se haverá multiplicação e disseminação dos bacilos associados às manifestações clínicas (Tuberculose-doença);

- A partir de então, a Tuberculose é caracterizada nos indivíduos imunocompetentes por um longo período de latência (MATHEMA et al., 2002) que devido a redução da imunidade celular, poderá recrudesce a partir de um foco de Tuberculose-infecção, a chamada Tuberculose pós-primária (SUCCI, 1990) como ocorre especialmente nos casos de AIDS, terapia imunossupressiva, desnutrição e alcoolismo, entre outras (LILLEBAEK et al., 2002).

Vários estudos sustentam a hipótese de que os indivíduos com Tuberculose-doença, ao invés de uma resposta Th1 como ocorre na Tuberculose-infecção, apresentariam uma resposta polarizada para Th2.

ROJAS et al. (1999) baseados na importância da ativação macrófaga pelo IFN- γ e sua inibição pela IL-10 e TGF- β , estudaram os efeitos dessas citocinas sobre as células CD4+ e células $\gamma\delta$ reativas aos antígenos micobacterianos, constatando que os pacientes com Tuberculose-doença apresentam aumento na produção dessas duas últimas citocinas e redução na produção de IFN- γ , levando a uma inabilidade dos macrófagos e células T em controlar a infecção.

Os autores constataram também que em relação ao TGF- β , o aumento da IL-10 foi muito mais significativo na inibição macrófaga, tanto na atividade micobactericida quanto na atividade apresentadora de antígeno (APC).

BHATTACHARYYA et al. (1999) compararam a produção de citocinas Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4) em linfócitos estimulados por antígenos micobacterianos em pacientes com Tuberculose e seus contactantes familiares, e concluíram que os contactantes apresentavam maior número de células expressando IFN- γ e com maior produção dessa citocina.

ABEBECH et al. (1999), em um estudo semelhante, analisaram 8 pacientes com Tuberculose leve, 22 pacientes com Tuberculose severa e 25 contactantes domiciliares desses pacientes e, concluíram que os contactantes, quando comparados aos doentes, apresentaram melhor resposta linfoproliferativa aos antígenos micobacterianos e mitógenos e um substantivo aumento na produção de IFN- γ .

RODRIGUES et al. (2002) estudaram 20 pacientes com Tuberculose recém diagnosticada e tratada, constatando que os pacientes com doença ativa possuem um baixo número de células T CD4 e CD8 e presença de ativação celular, demonstrada pelo aumento na porcentagem de células que expressam o marcador CD38. O autor também descreve que o tratamento resulta em um aumento progressivo das células CD4 e CD8, em todas as sub-populações, sejam elas, células naive, efectoras ou de memória.

A defesa contra o *Mycobacterium tuberculosis* depende então de uma intensa resposta celular caracterizada pelo predomínio de produção de IFN- γ sobre as citocinas reguladoras da resposta Th2, especialmente a IL-10.

Os pilares principais na abordagem de saúde pública frente à tuberculose são: o tratamento efetivo dos doentes e a identificação dos indivíduos infectados (infecção latente).

Sabe-se que ao se adquirir a imunidade celular contra o *Mycobacterium tuberculosis* surge no indivíduo a hipersensibilidade tuberculínica, responsável pela lise celular quando um indivíduo previamente sensibilizado é exposto à tuberculoproteína e que permanece por muitos anos, enquanto existirem bacilos viáveis e que pode ser detectada por intradermorreação do PPD (HUEBNER et al., 1993).

A identificação dos indivíduos com infecção latente mais comumente se faz pela intradermorreação da tuberculina, o PPD: um precipitado bruto de mais de 200 antígenos de *M. tuberculosis*, comuns

também ao *M. bovis*-BCG; cuja reação local determina uma resposta de hipersensibilidade tardia em indivíduos sensíveis (LALVANI et al., 2001).

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA (2002), considera-se uma intradermorreação positiva ao PPD quando houver uma enduração maior que 5mm nos indivíduos de alto risco (por exemplo indivíduos soropositivos para o HIV), de 10 mm. nos pacientes de médio risco e acima de 15 mm. nos de baixo risco (LEE & HOLZMAN, 2002).

O teste de PPD é realizado aplicando-se 0,1 ml. (2 UT) do PPD RT23 (cujo resultado guarda equivalência com 5 UT de PPD-S utilizado em vários países) por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo. A leitura é realizada 72 a 96 horas após, interpretando-se como a seguir:

- a) Não-reator - quando não se forma um nódulo ou, caso forme-se, meça até 4 mm., interpretando-se como indivíduo não infectado ou com redução da hipersensibilidade;
- b) Reator Fraco – formação de um nódulo entre 5 e 9 mm., considerando-se como indivíduo vacinado pelo BCG ou infectado tanto pelo *M. tuberculosis* como por outras micobactérias;
- c) Reator Forte – formação de um nódulo maior que 10 mm., considerando-se como indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis* ou vacinado pelo BCG nos últimos 2 anos.

Portanto, a grande desvantagem do uso do PPD na identificação de indivíduos infectados é a existência de uma baixa sensibilidade da resposta por reação antigênica cruzada em indivíduos vacinados pelo BCG ou infectados por outras micobactérias que possuem proteínas

análogas ao *M. tuberculosis* (HUEBNER et al., 1993). Portanto, é necessário encontrar antígenos mais específicos para uma correta interpretação e estudos que estabeleçam seu real papel de diferenciação dos grupos de indivíduos mencionados acima.

Nossa proposta constituiu-se em estudar a resposta imune frente aos antígenos de *M. tuberculosis* em indivíduos com Tuberculose-doença; infectados sadios e naqueles que se curaram de um episódio de Tuberculose. Procurando uma melhor compreensão dos mecanismos imunopatogênicos relacionados à doença.

Avaliamos, paralelamente, a resposta imune ao antígeno bruto/completo de MTb, um antígeno obtido a partir de sonicação de bacilos (antígeno sonicado), que já vinha sendo utilizado em nosso laboratório para avaliar a imunidade celular de pacientes com TB (PEREIRA et al., 2004).

PEREIRA et al., 2004 demonstraram que monócitos de pacientes com tuberculose, especialmente aqueles com manifestações sistêmicas da doença, secretam mais IL-10 e TNF- α e menos IL-12 quando comparados com indivíduos saudáveis e reativos ao PPD. Quando se adicionou linfócitos às culturas destes monócitos não ocorreram mudanças quanto a liberação de IL-10, IL-12 e TNF- α no grupo de pacientes.

Por se tratar de um complexo antigênico que apresenta antígenos compartilhados com outras micobactérias, inclusive a cepa BCG do *Mycobacterium bovis*, estabelecemos como prioridade o uso de antígenos purificados visando uma maior especificidade na resposta imune celular.

Para esse fim, utilizamos três antígenos purificados de *M. tuberculosis* descritos recentemente na literatura (foram objetos de estudo da imunidade celular na TB), e têm sido propostos tanto para o diagnóstico como para vacinas anti-TB:

1) Optamos, primeiramente, pelo uso do ESAT-6, um antígeno proposto como tendo alto valor preditivo para a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, em contraposição a outras micobactérias. (LEIN et al., 1999).

ANDERSEN et al. (1994) estudaram um antígeno denominado de *M. tuberculosis* – Specific Early Secreted Antigen Target 6 kDa (ESAT-6), um antígeno secretado que é altamente específico para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e cujas propriedades principais são o estímulo a células T de pacientes infectados em proliferar e produzir IFN- γ .

O ESAT-6 é um antígeno de baixo peso molecular, secretado pelo bacilo, específico do *Mycobacterium tuberculosis-complex*, que possui dois epítomos para as células T e induzem uma forte resposta celular (POLLOCK & ANDERSEN, 1997).

O gene que o codifica o ESAT-6 fica localizado na região RD1, inexistente nas demais micobactérias, incluindo a cepa BCG do *Mycobacterium bovis* já que durante o processo de atenuação da cepa ocorre a deleção deste gene (GELUK et al., 2002).

Baseados no fato do ESAT-6 ser ausente nas cepas BCG e de outras micobactérias que não pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sabemos que os contactantes domiciliares dos pacientes de tuberculose reagem melhor ao ESAT-6 do que os indivíduos doentes, sendo que, se na doença leve ainda há resposta, na doença severa ela se mostra bastante reduzida (RAVN et al., 1999).

Em um estudo com casuística brasileira, CARDOSO et al., 2002 utilizando o ESAT-6 concluiu que 59% dos indivíduos vacinados pelo BCG são respondedores ao ESAT-6 diferentemente da resposta de 100% ao PPD. Provavelmente apenas estes 59% na realidade estavam infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*, já que indivíduos PPD não reatores também não respondem ao ESAT-6 (DOHERTY et al., 2002).

Tal achado se baseia no fato de que o controle da Tuberculose evoca uma forte resposta imune mediada por células e LALVANI et al. (2001), estudando a detecção por Elispot (método baseado no princípio de sandwich-capture Elisa) que determina o número de Células Formadoras de Spots (CFS) de IFN- γ específico contra o ESAT-6, concluíram haver um estímulo fortemente positivo e específico, não havendo reação cruzada com a vacinação pelo BCG.

ULRICHS et al. (2000), realizaram estudo comparativo em relação ao número de CFS para IFN- γ específico para a proteína ESAT-6 em grupos controles normais, pacientes PPD positivo recentemente convertido e em pacientes com tuberculose ativa, utilizando o Elispot. Neste ensaio houve um aumento do número de CFS nos grupos PPD+ e no grupo com Tuberculose ativa, quando comparados com o grupo controle composto por doadores saudáveis vacinados ou não com BCG, mostrando que o antígeno ESAT-6 pode ser potencialmente utilizado como um antígeno nos diagnósticos de Tuberculose nos pacientes sub-clínicos e ativos.

Portanto, a detecção de células produtoras de IFN- γ (Elispot) quando estimuladas pelo ESAT-6, possui maior sensibilidade e especificidade quando comparada ao teste cutâneo com PPD, por não haver reação cruzada pela vacinação pelo BCG e pela alta sensibilidade para a detecção de infecção latente (EWER et al., 2003).

Além disso, se a resposta imune ao ESAT-6 permite discriminar a infecção entre *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* (LEIN et al., 1999), precisamos estar atentos à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, pois a mesma possui um antígeno homólogo ao ESAT-6, denominado L-ESAT-6 e que pode induzir reações cruzadas entre as duas bactérias.

2) Um segundo antígeno purificado que nos propusemos a estudar é o HBHA (Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesin), uma adesina micobacteriana de 28-kDa, purificada de sobrenadantes de

cultura e extratos celulares do *Mycobacterium bovis* e do *Mycobacterium tuberculosis*, que possui função de aderência a células epiteliais (MENOZZI et al., 1996 & MENOZZI et al., 1998).

MASUNGI et al (2002), avaliando a produção de IFN γ após estimulação com o HBHA em indivíduos sadios infectados (PPD positivos) mostraram que 60% das células mononucleares destes pacientes produziram IFN- γ específica para este antígeno, enquanto somente 4% dos pacientes com Tuberculose ativa produziram tal citocina.

Estas observações indicam que o antígeno HBHA é reconhecido diferentemente pelo sistema imune de pacientes com Tuberculose e indivíduos sadios infectados e poderiam fornecer um marcador para a proteção contra a esta patologia.

3) Por último, utilizamos o antígeno de *M. tuberculosis* denominado Ag85B. O Complexo 85 de *M. tuberculosis* possui duas bandas, uma banda de 32 kDa que contém os antígenos 85A e 85C e outra de 30 kDa que contém o antígeno 85B. São micolil-transferases com papel essencial na síntese da parede celular bacteriana que se ligam a fibronectinas do plasma e células, possuindo um importante papel na adesão e motilidade celular, função fagocítica e inflamação. (BENTLEY-HIBBERT et al.,1999).

De acordo com JO et al. (2000), o complexo antigênico 85, 85A, 85B e 85C, se constituem nas principais proteínas secretórias do *Mycobacterium tuberculosis* com atividade replicativa e estão presentes em todas as micobactérias. São obtidas pela purificação de proteínas de 32 kDa do *Mycobacterium bovis* – BCG e de *Mycobacterium tuberculosis* em replicação.

De acordo com JO et al. (2000) as moléculas 85A , 85B e 85C do complexo antigênico 85 constituem-se na principais proteínas secretórias do *M. tuberculosis* com atividade replicativa e estão presentes em todas as micobactérias. São obtidas pela purificação de

proteínas de 32 kDa do *Mycobacterium bovis* – BCG e do *Mycobacterium tuberculosis* em replicação.

JO et al (2000) mostraram que os níveis de IFN- γ de células estimuladas pelo Ag85B estavam significativamente diminuídos em pacientes com Tuberculose quando comparados aos controles sadios reatores ao PPD e aos indivíduos que receberam pelo menos dois meses de tratamento anti-Tuberculose.

Além disso, as proteínas do Complexo 85 induzem uma forte resposta celular e humoral (HUYGEN, et al., 1988), e por este motivo, da mesma forma que o ESAT-6, as proteínas do complexo-antígeno 85 (especialmente o Ag85B) estão entre as principais proteínas que têm sido estudadas para o desenvolvimento de uma futura vacina contra a tuberculose (BELISLE et al., 1997).

2. OBJETIVOS

A Tuberculose é uma doença que tem causado a morte de milhares de indivíduos no Brasil e no Mundo. Cerca de um terço da população mundial está infectada pela bactéria, porém sem desenvolver a doença. Devido a esta alta incidência, torna-se necessária uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento desta patologia e de novos protocolos de estudo da doença.

Com a finalidade de iniciarmos o estudo da resposta imunológica em pacientes com Tuberculose-doença e Tuberculose-infecção em nosso laboratório, analisamos comparativamente a resposta imune celular a quatro diferentes antígenos: um complexo e três purificados de *M. tuberculosis*, nos indivíduos estudados. Utilizamos duas metodologias já empregadas rotineiramente (em outros protocolos) em nosso laboratório: Elisa e linfoproliferação. E uma terceira foi implantada, o Elispot, considerada, eventualmente, de escolha para avaliação da resposta imune em protocolos de estudos de novas vacinas.

Avaliamos a linfoproliferação após estímulo com antígenos micobacterianos, a produção de IFN- γ e IL-10 através da técnica de Elisa e Elispot e a correlação entre as metodologias. Para tanto recrutamos três grupos de estudo :

- um de indivíduos com Tuberculose ativa (TB-A);
- um de indivíduos com Tuberculose já curada (TB-C) e
- um constituído de indivíduos saudáveis, PPD positivos (PPD+).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, protocolos 040/03 e 32/02 respectivamente.

Foram obtidos os consentimentos informados, aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de todos os pacientes bem como dos voluntários que participaram como controle.

Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório do Instituto de Infectologia Emilio Ribas e os exames imunológicos específicos no Laboratório de Investigação Médica, Unidade 56 (LIM 56) do HC-FMUSP.

3.1.1. Pacientes

Foram estudados 12 pacientes com Tuberculose ativa com idade variando entre 15 e 59 anos (média de 38,6 anos), sendo 7 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, diagnosticados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo-SP.

O diagnóstico de Tuberculose foi estabelecido por cultura positiva para o *M. tuberculosis* em 4 pacientes, baciloscopia de escarro positiva em 5 pacientes, biópsia de tecido mostrando granulomas com bacilos em 2 pacientes e em um caso de Tuberculose disseminada, que não foi possível recuperar o agente em hemocultura. Este paciente teve o diagnóstico de TB baseado em

quadro clínico compatível (Mal de Pott com infecção sistêmica associada).

Dois grupos controles, compostos por indivíduos saudáveis, foram também avaliados:

- A) - indivíduos saudáveis com intradermoreação com PPD acima de 10 mm (PPD+);
- B) - indivíduos curados de tuberculose (TB-C).

O grupo A foi constituído por 20 indivíduos, sendo 12 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com idade variando entre 19 e 76 anos (média 40,7 anos) e o grupo B por 12 indivíduos, sendo 6 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com idade variando entre 15 e 61 anos (média 37,1 anos). O tempo decorrido desde a cura da Tuberculose foi variável, de 4 meses até 10 anos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Antígenos e mitógeno

Nos ensaios imunológicos utilizamos antígenos e mitógeno.

Quanto aos antígenos de tuberculose utilizamos um antígeno bruto de *Mycobacterium tuberculosis*, obtido por sonicação de cepa Mtb-H37Rv e gentilmente cedido pelo Dr. Moisés Palaci; HBHA, gentilmente cedido pelo Prof. Camille Lochet do Laboratoire de Microbiologie Genetique et Moleculaire, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U447, Institut Pasteur de Lille, France, o ESAT-6 e Ag85B, estes dois últimos cedidos pelo Dr. Sérgio Costa Oliveira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Estes antígenos foram testados e padronizados em nosso laboratório, onde encontramos a concentração ideal para utilização no Elispot.

Para o antígeno sonicado, utilizamos a concentração padronizada em nosso laboratório para uso em nossa rotina diagnóstica por PEREIRA, C.B (2003).

Dos antígenos purificados, tanto o ESAT-6 quanto o 85B, utilizamos as concentrações de 3 µg/ml, conforme dados da literatura (ULRICHS et al. 2000), e que foram as que obtivemos melhor resposta em experimentos preliminares com indivíduos PPD+.

Para o HBHA, utilizamos a concentração de 800 pg/ml, seguindo a orientação do Prof. Camille Lotch que nos cedeu o material e dados da literatura. O grupo do Prof. Locht é o responsável pela obtenção e descrição deste antígeno, com o qual está iniciando estudos para obtenção de vacinas anti-TB (MASUNGI et al., 2002). Esta concentração foi testada em voluntários PPD+ quando da padronização dos nossos ensaios de Elispot, fornecendo resultados satisfatórios.

Como mitógeno foi usada a Fito-hemaglutinina (PHA) (Sigma), na diluição preconizada e em uso no laboratório.

3.2.2 Elispot

A padronização da metodologia de Elispot para IFN-γ seguiu dados da literatura. Estudamos vários protocolos com diferentes concentrações de células, tempos de incubação, tipos de placa, diluições do conjugado, etc. Inicialmente, testamos concentrações diferentes de células como 1×10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 células por cavidade, a concentração do anticorpo biotinilado (iniciamos com 1 µg/ml, aumentando até 3 µg/mL), e variamos o período de incubação de 1, 2 e 24 horas. A diluição do conjugado fosfatase alcalina variou de 1:1000 a 1:6000. Após várias modificações, definimos o protocolo que, em nossas condições, mostrou grande número de *spots* após estímulo com PHA, com baixa formação espontânea de *spots*, e sem coloração de fundo impeditiva para a leitura, com as seguintes características:

concentração de células 1×10^5 células por cavidade; $1 \mu\text{g/ml}$ de anticorpo biotilado; período de incubação de 2 horas; diluição de 1:6000 do conjugado fosfatase alcalina para incubação de uma hora; e tempo de incubação das células de 72 horas. A padronização da IL-10 segue o mesmo padrão para IFN- γ , excetuando-se o período de incubação das células que foi de 48 horas e placas do kit da Becton Dickson Inc.

3.2.3 Separação de Células Mononucleares

Foram colhidos cerca de 15 ml de sangue em tubo estéril heparinizado, dos pacientes e controles. O sangue foi depositado sobre um gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque), centrifugado a 2.200 rpm por vinte minutos. Foram recolhidos os anéis de células mononucleares, lavadas em solução salina por duas vezes e ajustada a concentração para 2×10^6 células por ml para o ensaio de linfoproliferação e 1×10^6 células por ml para o ensaio de Elispot, diluído em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro AB. A viabilidade celular foi realizada com o uso do Azul de Trypan e esteve sempre acima de 95%.

3.2.4. Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico para Ensaio de Linfoproliferação e Secreção de Citocinas

As células foram cultivadas em placas de 96 alvéolos (Costar, USA) em volume de 0,1ml, contendo 2×10^5 de PBMC, em meio RPMI 1640, enriquecido a 10% de pool de soro AB humano (Sigma), 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 6 dias.

Antígenos (ESAT-6, Ag85B, HBHA e Antígeno Bruto Sonicado de *Mycobacterium tuberculosis*) foram adicionados aos alvéolos em volumes de 100 µl/alvéolo. Dezoito horas antes do término do cultivo, as culturas foram pulsadas com timidina tritiada (Amersham International, UK), 1 uCi/alvéolo e as culturas aspiradas com auxílio de coletor de células automático (Mach II, Tomtek) em membranas de nitrocelulose (Flow Laboratories).

A radioatividade incorporada foi medida em contador Betaplate 1205 (Wallac) e o resultado apresentado em média aritmética de triplicatas de alvéolos estimulados menos média aritmética de alvéolos não estimulados (BENARD *et al.*, 1995 & BENARD *et al.*, 1996), ou por índice de estimulação (IE), em que a média dos triplicatas estimuladas foi dividida pela média das triplicatas não estimuladas.

Para a dosagem de IL-10 e IFN- γ em sobrenadantes de cultura, os PBMC foram cultivadas da mesma forma que acima em presença de PHA, Antígeno de *Cândida albicans* (CMA), HBHA, Antígeno Sonicado de *Mycobacterium tuberculosis* e meio de cultura somente (controle) e em volumes finais de 0,2 ml em placas de 96 alvéolos.

Os sobrenadantes e células foram coletados com 72 (IL-10) e 120 horas (IFN- γ) de cultivo e centrifugados para eliminar debris celulares. Foram aliquotados sendo conservados a -70°C até a dosagem das citocinas por Elisa. Sobrenadantes para dosagens de IL-10, foram coletadas das culturas estabelecidas para Elispot; para dosagem de IFN- γ , os sobrenadantes foram coletados da cultura estabelecidas para linfoproliferação.

3.2.5. Quantificação de Células Produtoras de Spots (CFS) para IFN- γ por Elispot

Cada alvéolo de uma placa de Elispot (Multiscreen – 96 well filtration plate, 4510, Millipore) foi sensibilizada em ambiente estéril com

5 µg/ml. de anti-IFN- γ (M-700A-Endogen) diluído em tampão carbonato-bicarbonato, 100 µl por alvéolo, que se ligam à base de nitrocelulose da placa.

A placa foi incubada “overnight” a 4°C, e após esse período, foi lavada 2 vezes com PBS, em ambiente estéril. Em seguida foi adicionado o tampão de bloqueio (PBS + 3% de BSA) em ambiente estéril e a placa incubada a 37° C por 2 horas.

A placa foi novamente lavada 2 vezes com PBS, em ambiente estéril e os PBMC cultivados em RPMI colocados em cada alvéolo, em duplicatas de 1×10^5 células. Foram adicionados mitógeno (PHA) e antígenos (sonicado de MTb, HBHA, ESAT-6 e 85B), conforme padronização prévia

A placa foi então incubada por 72 horas a 37° C, e, após este procedimento adicionado o anti-IFN- γ biotilado (M-701B – Endogen) na concentração de 1 µg/ml, diluído em tampão PBS 1% BSA e incubado por 2 horas a 37°C.

Após este período a placa foi lavada 12 vezes manualmente, com PBS 0,05% de Tween 20, e terminado este procedimento foi adicionado 100 µl por alvéolo de Streptoavidina-Fosfatase alcalina, previamente diluída 1:4000 em PBS 1% de BSA e incubada a 37° C por 1 hora.

Em seguida, a placa foi novamente lavada 12 vezes manualmente com PBS 0,05% de Tween 20, e em seguida, foi colocado 100 µl por alvéolo da solução substrato(BCIP), incubando-se a placa no escuro a temperatura ambiente por 15 minutos.

Desprezou-se o todo líquido contido na placa e para assegurar parada de reação lavou-se 20 vezes com H₂O deionizada.

A placa foi secada 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) para IFN- γ (colaboração da Dra Simone Fonseca do LIM 19 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (SP) e da Dra Patrícia Furtado do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (UFPE, Recife, PE). Consideramos positivos os resultados que apresentaram pelo menos 50 *spots* por milhão de células, subtraídos da produção basal, de acordo com SHAMS et al. 2001 e FLANAGAN et al 2001. (Figura 1)

3.2.6. Determinação de Células Produtoras de IL-10 por Elispot

Para o ensaio de Elispot para IL-10, utilizamos kit proveniente da Becton Dickson Inc. (USA).

Inicialmente as placas foram sensibilizados com 100 μ L de anticorpo anti-IL-10 diluído em PBS na concentração de 5 μ g/ml e armazenados em temperatura entre 4 a 8° C por 24 horas.

No momento da utilização, cada alvéolo da placa foi lavada uma vez com 100 μ l de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e foram adicionadas 200 μ L de meio RPMI-1640 + 10% de SFB e incubados a temperatura ambiente por 2 horas.

Após este período, os meios de culturas foram desprezados e adicionadas 1×10^5 células mononucleares dos pacientes e controles.

Foram adicionados mitógeno (PHA) e antígenos (sonicado de MTb, HBHA, ESAT-6 e 85B) nas concentrações previamente definidas.

As placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com água destilada por duas vezes e com PBS + 0,05% de Tween 20 por três vezes. Foram adicionados 100 μ l de anticorpos anti-IL-10 marcados com biotina, na concentração de 1 μ g/ml. As placas foram incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, as placas foram lavadas com PBS + Tween 20 por cinco vezes e adicionados 100 µl de anticorpos anti-IL-10 conjugados com fosfatase alcalina, na diluição de 1:6000 e incubados por trinta minutos. Após este período, as placas foram lavadas com PBS + Tween 20 por duas vezes e somente PBS por mais três vezes.

Foram adicionados 50 µl de substrato (BCIP) e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. A seguir, as placas foram lavadas vinte vezes com água destilada, secadas e armazenadas no escuro por 24 horas.

As leituras foram efetuadas contando-se o número de células formadoras de *spots* em cada uma das cavidades no equipamento Immunospot (Cellular Technology Ltda, Cleveland – Ohio). Figura 2

3.2.7. Determinação da Produção de IL-10 e IFN- γ em Sobrenadantes de Cultura de PBMC por Elisa

Microplacas de poliestireno com 96 alvéolos (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ e anti-IL-10 humana (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 2 horas a temperatura ambiente e lavadas com Tris HCl 5 mM, 0,1 % Tween.

Os sobrenadantes, curva padrão (10–1000 pg/mL) e anticorpos monoclonais anti-IFN- γ e anti-IL-10 humanos biotinilados (1µg/ml, Endogen USA) foram adicionados aos alvéolos e as placas permaneceram 2 horas a temperatura ambiente.

Após nova lavagem com Tris HCl 5mM 0,1% Tween foi adicionada streptavidina-peroxidase (1/1000 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 leitor de Elisa com filtro 450 nm (leitora Biorad, Hercules, CA) e a concentração determinada por relação densidade óptica x curva padrão (utilizando software GraphPrism).

O limite de detecção do teste para as citocinas foi de 10 pg/ml.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos para comparações de três condições experimentais o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

As correlações possíveis foram estabelecidas pelo teste de não paramétrico de Spearman. Foram consideradas como fortes as correlações aquelas cujo valor “r” foi igual ou maior a 0,7; moderadas entre 0,5 e 0,69; fracas quando menor que 0,5m de acordo com ROTHMAN & GREENLAND (1998). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para aquelas diferenças com $p < 0,05$.

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prisma 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA POR ÍNDICE DE ESTIMULAÇÃO E γ CPM E DA PRODUÇÃO DE IFN- γ POR ELISA

Neste seguimento analisamos os resultados dos experimentos empregando 2 metodologias utilizadas rotineiramente em nosso laboratório, portanto já conhecidas, para avaliar a resposta imune à PHA e aos antígenos de *M. tuberculosis* nos 3 grupos de indivíduos.

4.1.1. Proliferação Espontânea (Figura 3)

Os valores da proliferação espontânea das culturas de linfócitos, ou seja, sem estímulo exógeno, foram relativamente baixos, estando as medianas dos 3 grupos abaixo de 1000 cpm: medianas de 361 cpm no grupo PPD+, 189 cpm no grupo TB-A, e de 661 cpm no grupo TB-C. Houve diferença significativa entre os grupos TB-A e TB-C ($P < 0,05$). As medianas da liberação espontânea de IFN- γ avaliados por Elisa nos sobrenadantes destas mesmas culturas também foram muito baixas: grupo TB-A, 12 pg/ml; TB-C, 8,6 pg/ml; e PPD+, 15 pg/ml. É importante notar que a resposta proliferativa aumentada do grupo TB-C não correspondeu maior produção espontânea de IFN- γ .

Figura 3. Reatividade espontânea (sem estímulo antigênico) avaliada por linfoproliferação (cpm) e por produção de IFN- γ (Elisa) nos grupos TB-A ($\bullet$, $n = 10$ para linfoproliferação e 12 para Elisa); TB-C ($|$, $n = 12$) e PPD+ (Δ , $n = 19$ para linfoproliferação e 20 para Elisa).

4.1.2. Resposta ao Mitógeno Fitohemaglutinina (PHA)- (Figura 4)

Os resultados da resposta à PHA por cpm, ou seja, descontando-se a proliferação espontânea, mostraram uma diversidade de resposta, especialmente nos grupos TB-A e TB-C, em que 4 de 10 (40%) e 4 de 12 (30%) pacientes apresentando resposta mais baixas (< 20.000 cpm), enquanto no grupo PPD+, o mesmo ocorreu com apenas com 2 indivíduos (10%). Em relação aos níveis de proliferação, observou-se maiores níveis na resposta do grupo PPD+, entretanto houve diferença significativa apenas entre este grupo e o grupo TB-C ($p < 0,05$).

Na avaliação da resposta linfoproliferativa medida por índice de estimulação (IE) pudemos observar uma maior dispersão dos resultados nos 3 grupos, principalmente no de pacientes e no grupo PPD+, resultando em uma ausência de diferenças significativas entre estes grupos. Percebe-se entretanto uma nítida tendência de diminuição de resposta no grupo TB-C, provavelmente em virtude da maior proliferação espontânea observada neste grupo, descrita no item anterior.

Em relação à dosagem de IFN- γ nos sobrenadantes, observou-se também uma grande variabilidade nos resultados de cada grupo; porém a maioria dos indivíduos apresentaram produção considerável da citocina. Não houve diferença significativa entre os 3 grupos.

Figura 4. Resposta à PHA avaliada por linfoproliferação, medida por ^3H cpm e IE, e por produção de IFN- γ , medida por Elisa nos grupos TB-A (●, $n = 10$ para linfoproliferação e 12 para Elisa); TB-C (■, $n = 12$) e PPD+ (▲, $n = 19$ para linfoproliferação e 20 para Elisa).

4.1.3. Resposta ao Antígeno Sonicado (Figura 5)

Os resultados da resposta ao antígeno bruto de MTb (sonicado) mostraram que no grupo TB-A houve uma resposta proliferativa (^3H cpm) diminuída, com valores baixos (< 10000 cpm) em 6 dos 10 pacientes testados, enquanto no grupo TB-C o mesmo ocorreu em 4 de 12

pacientes. No grupo PPD+, apenas 1 dos indivíduos apresentou γ cpm muito baixo. Houve diferença significativa somente entre os grupos PPD+ e TB-A ($p < 0,05$), apesar de se observar também nítida diferença entre os grupos PPD+ e TB-C.

Em relação aos resultados por índice de estimulação, verificamos que houve diminuição significativa de resposta nos grupos TB-C e TB-A em relação ao grupo PPD+ ($p < 0,01$). Houve nitidamente maior proporção de pacientes tanto curados como com doença ativa com resposta baixas.

A avaliação da produção de IFN- γ revelou uma tendência à diminuição de resposta no grupo TB-A em comparação com os outros grupos, sendo muito baixa em 4 de 12 pacientes testados, enquanto produção muito baixa ocorreu em apenas 1 dos 20 indivíduos PPD+ e em 2 dos 12 indivíduos do grupo TB-C. Em relação às medianas de produção da citocina, não houve diferenças significativas entre os três grupos, apesar de se observar uma tendência a aumento progressivo da mediana de pacientes com doença ativa para curados e destes para o grupo PPD+ (871 vs. 1859 vs. 2255 pg/mL).

Figura 5. Resposta ao antígeno sonicado avaliada por linfoproliferação, medida por ^3H cpm e IE, e por produção de IFN- γ , medida por Elisa, nos grupos TB-A (●, $n = 10$ para linfoproliferação e 12 para Elisa); TB-C (■, $n = 12$) e PPD+ (▲, $n = 18$ para linfoproliferação e 20 para Elisa).

4.1.4. Resposta ao Antígeno ESAT-6 (Figura 6)

Os resultados da resposta ao antígeno específico ESAT-6 mostraram diminuição da resposta linfoproliferativa (^3H cpm) no grupo TB-A, com todos os pacientes apresentando valores inferiores a 1000 cpm, enquanto 6 dos 12 (50%) indivíduos testados no grupo TB-C e somente 8 dos 18 (44%) indivíduos testados no grupo PPD+ apresentaram valores inferiores a 1000 cpm. Houve diferença significativa entre as medianas de proliferação dos indivíduos do grupo PPD+ e TB-A ($P < 0,01$).

A avaliação dos resultados de linfoproliferação por índice de estimulação revelou também uma tendência à diminuição no grupo TB-A em relação aos demais grupos, porém houve significância estatística somente entre os grupos PPD+ e TB-A ($p < 0,05$).

Na avaliação dos resultados de IFN- γ por Elisa, verificamos que 10 dos 12 indivíduos do grupo TB-A (83,3%) produziram quantidades muito reduzidas (inferiores a 50 pg/ml), enquanto 9 dos 20 indivíduos PPD+ (45%) e 3 dos 12 indivíduos do grupo TB-C (25%) apresentaram produção de IFN- γ inferior a 50 pg/ml. Houve diferença significativa entre as medianas dos grupos PPD+ e TB-A ($p < 0,05$) e entre TB-A e TB-C ($p < 0,05$).

Figura 6. Resposta ao ESAT-6 avaliada por linfoproliferação, medida por ^3H cpm e IE, e por produção de IFN- γ , medida por Elisa, nos grupos TB-A ($\bullet$, $n = 10$ para linfoproliferação e 12 para Elisa); TB-C ($\blacksquare$, $n = 12$) e PPD+ ($\blacktriangle$, $n = 17$ para linfoproliferação e 20 para Elisa).

4.1.5. Resposta ao Antígeno 85B (Figura 7)

Os resultados de linfoproliferação (^3H cpm) após estimulação com o antígeno específico 85B revelaram que as medianas das respostas do Grupo TB-C e TB-A são muito baixas: apenas 2 indivíduos (20%) do grupo TB-A e 1 (16%) do grupo TB-C apresentaram contagens superiores a 1000 cpm, sendo que no grupo PPD+, 14 dos 18 indivíduos testados (77,7%) tiveram contagens superiores a 1000 cpm.

Foram observadas significâncias estatísticas entre os grupos PPD e TB-A ($p < 0,05$) e entre os grupos PPD e TB-C ($p < 0,05$).

Na análise por IE, verificamos que tanto no grupo TB-C como TB-A 50% dos pacientes testados (6 de 12 e 5 de 10, respectivamente) apresentaram índice de proliferação superior a 2,0. Por outro lado, no grupo PPD+, 14 dos 18 indivíduos testados (77,7%) apresentaram índice de proliferação superior a 2,0. Apesar dos resultados igualmente diminuídos dos grupos TB-A e TB-C, a análise revelou diferença estatisticamente significativa somente quando comparados os grupos PPD+ e TB-C ($p < 0,05$).

No Elisa, verificamos que no grupo TB-C, 7 dos 12 indivíduos (58,3%) avaliados tiveram produção de IFN- γ superior a 50 pg/ml. Já no grupo TB-A o mesmo ocorreu com apenas 2 de 12 indivíduos (16,6%), enquanto no grupo PPD+, dos 20 indivíduos testados, 6 (80%) apresentaram produção de IFN- γ superior a 50 pg/ml. Desta forma, observou-se diferenças estatisticamente significativas apenas quando comparados as medianas dos grupos PPD+ e TB-A ($p < 0,001$), apesar de haver apreciável diferença também entre o grupo PPD+ e o grupo TB-C.

Figura 7. Resposta ao antígeno 85B avaliada por linfoproliferação, medida por ^3H cpm e IE, e por produção de IFN- γ , medida por Elisa, nos grupos TB-A ($\bullet$, $n = 10$ para linfoproliferação e 12 para Elisa); TB-C ($\blacksquare$, $n = 12$) e PPD+ ($\blacktriangle$, $n = 18$ para linfoproliferação e 20 para Elisa).

4.1.6. Resposta ao Antígeno HBHA

Os resultados de linfoproliferação (^3H cpm) após estímulo com o antígeno específico HBHA revelaram medianas muito baixas nos 3 grupos, com poucos indivíduos apresentando contagens acima de 2000 cpm: nenhum (em 10) do grupo com TB-A, apenas 2 (em 12) do grupo TB-C, e 3 (em 18) do grupo PPD+. Não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos.

Na análise por índice de estimulação da resposta linfoproliferativa, da mesma forma, com a dose empregada, verificamos resultados desapontadores: apenas 41,6% dos indivíduos do grupo TB-C, ou seja 5 em 12, apresentaram índice de proliferação igual ou superior a 2,0; no grupo TB-A, apenas 4 dos 10 indivíduos do grupo

(40%) apresentaram índice superior a 2,0; e no grupo PPD, 6 indivíduos de 18 apresentaram índice de proliferação superior a 2,0, (33,3%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Nas dosagens de IFN- γ dos sobrenadantes por Elisa, verificamos que no grupo TB-A apenas 1 de 12 indivíduos apresentou dosagem de IFN- γ superior a 50 pg/ml. No grupo TB-C, 2 dos 12 indivíduos que compõem o grupo tiveram produção de IFN- γ superior a 50 pg/ml. Já no grupo PPD+, 4 de 20 indivíduos apresentaram produção de IFN- γ superior a 50 pg/ml. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

4.2. CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE ELISA E LINFOPROLIFERAÇÃO

Procuramos analisar neste seguimento a possível correlação entre os resultados apresentados por 2 metodologias já bem estabelecidas e rotineiramente empregadas em nosso laboratório, sendo que, no caso da linfoproliferação, 2 modos de avaliação do resultado foram comparados: IE e 3 cpm.

4.2.1. Antígeno Sonicado

A comparação entre as metodologias empregadas demonstrou haver correlação significativa, porém fraca ($r < 0,5$), entre os resultados do Elisa e da linfoproliferação tanto por índice de estimulação como por 3 cpm, após estímulo com antígeno sonificado (Tabela 1).

		Cultura IE	Cultura ?cpm
Elisa	<i>N</i>	39	39
	<i>R</i>	0,34	0,41
	<i>P</i>	0,035	0,001

Tabela 1. Correlação entre resultados de linfoproliferação e Elisa após estimulação com antígeno sonicado

Na tabela 2 temos a comparação entre os dois modos de se avaliar os resultados de linfoproliferação, índice de estimulação e ?cpm, demonstrando forte correlação entre elas.

		Cultura ?cpm
C ultura IE	<i>N</i>	40
	<i>R</i>	0,81
	<i>P</i>	<0,0001

Tabela 2. Correlação entre linfoproliferação por ?cpm e por índice de estimulação

4.2.2. Antígeno ESAT-6

A comparação entre as técnicas de Elisa para IFN- γ e linfoproliferação por índice de estimulação ou ?cpm, para células estimuladas com ESAT-6, mostrou uma moderada correlação, melhor que a observada com antígeno sonicado (Tabela 3).

		Cultura IE	Cultura ?cpm
Elisa	<i>N</i>	39	39
	<i>R</i>	0,62	0,57
	<i>P</i>	<0,0001	<0,0001

Tabela 3. Correlação entre Elisa e linfoproliferação por ?cpm e IE em células estimuladas com Esat-6

Na tabela 4, observamos a forte correlação entre os modos IE e ?cpm para avaliação da linfoproliferação com ESAT-6.

		Cultura ?cpm
C ultura IE	<i>N</i>	40
	<i>R</i>	0,90
	<i>P</i>	<0,0001

Tabela 4. Correlação entre linfoproliferação por ?cpm e IE em células estimuladas com Esat-6

4.2.3. Antígeno 85B

A comparação entre as técnicas de Elisa para IFN- γ e linfoproliferação, tanto por índice de estimulação como ?cpm, em células estimuladas com antígeno 85B, mostrou também uma correlação fraca entre as técnicas empregadas (Tabela 5).

		Cultura IE	Cultura ?cpm
Elisa	<i>N</i>	39	39
	<i>R</i>	0,43	0,45
	<i>P</i>	0,006	0,004

Tabela 5. Correlação entre elisa e linfoproliferação por ?cpm e IE em células estimuladas com 85B

Na tabela 6, demonstramos a excelente correlação entre as metodologias por índice de estimulação e ?cpm para avaliação da linfoproliferação com antígeno 85B.

		Cultura ?cpm
Cultura IE	<i>N</i>	40
	<i>r</i>	0,95
	<i>P</i>	<0,0001

Tabela 6. Correlação entre linfoproliferação por ?cpm e IE em células estimuladas com 85B

4.2.4. Antígeno HBHA

A comparação entre as técnicas de Elisa para IFN- γ e linfoproliferação por índice de estimulação ou ?cpm, quando estimulados com antígeno HBHA, mostrou também uma fraca correlação entre as técnicas empregadas.

		Cultura IE	Cultura ?cpm
E	<i>N</i>	39	39
lisa	<i>R</i>	0,43	0,39
	<i>P</i>	0,007	0,014

Tabela 7. Correlação entre linfoproliferação por ?cpm e IE em células estimuladas com HBHA

Na tabela 8, demonstramos a forte correlação entre índice de estimulação e ?cpm para avaliação da linfoproliferação com HBHA.

		Cultura ?cpm
C	<i>N</i>	40
ultura IE	<i>r</i>	0,91
	<i>P</i>	<0,0001

Tabela 8. Correlação entre linfoproliferação por ?cpm e IE em células estimuladas com HBHA

4.3. USO DE MITÓGENO PHA E ANTÍGENOS DE *M. TUBERCULOSIS* (MTB) COMO ESTÍMULO ÀS CÉLULAS FORMADORAS DE SPOTS (CFS)

4.3.1. Valores Espontâneos

A avaliação dos resultados espontâneos (sem estímulo exógeno) das células formadoras de “spots” (CFS) demonstrou que, da mesma forma que na avaliação da resposta proliferativa, houve variabilidade na quantidade de “spots” formados, nos três grupos estudados.

Nos grupos PPD+, TB-A, e TB-C nós verificamos medianas de, respectivamente, 45 (percentis 25 e 75%, 20 e 105), 87,5 (percentis 25

e 75%, 27,5 e 225) e 87,5 (percentis 25 e 75%, 40 e 1260) CFS por milhão de células, quando contamos todos os spots formados, e, na contagem de spots maiores que 65 μ m de diâmetro, 25 (percentis 25 e 75%, 10 e 50), 42,5 (percentis 25 e 75%, 7,5 e 70) e 75 (percentis 25 e 75%, 35 e 320) respectivamente, CFS por milhão de células. Não houve diferenças significativas, apesar de uma tendência a número maior de spots no grupo PPD+ e TB-C em relação ao grupo TB-A.

4.3.2. Resposta ao Mitógeno PHA (Figura 8)

A contagem do número de CFS após estimulação com PHA, utilizado como controle positivo, revelou que todos os indivíduos do grupo PPD+ tiveram acima de 500 CFS por milhão de células. Já no grupo TB-A, em 3 de um total de 12 indivíduos (25%) não se detectou mais de 500 CFS, e no grupo TB-C tivemos apenas 1 indivíduo, de um total de 12 (8,3%), que não alcançou mais de 500 CFS/milhão de células, provavelmente pelo fato de ter grande número de CFS mesmo na ausência de estímulo exógeno (2925 CFS/milhão de células). Este resultado foi repetido e confirmado utilizando-se células congeladas do paciente.

Figura 8. Quantificação de CFS de IFN- γ na resposta a PHA avaliada por Elispot, nos grupos TB-A (•, $n = 12$), TB-C (■, $n = 12$) e PPD+ (▼, $n = 16$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos

4.3.3 Resposta ao Antígeno Sonicado (Figura 9)

4.3.3.1 Análise de CFS com Spots Totais

A análise dos resultados de CFS no Elispot total demonstrou que dos 19 indivíduos do grupo PPD+ 18 (94,7%) apresentaram números superiores a 50 CFS, estabelecido com limiar para resposta positiva. Em relação ao grupo TB-A, dos 12 indivíduos que compõem o grupo, em 10 observamos mais de 50 CFS (83,3%). No grupo TB-C verificamos que 7 dos 12 indivíduos (58,3%), tiveram acima de 50 CFS por milhão de células.

Embora a representação gráfica dos resultados sugira discreta diminuição da mediana do grupo TB-A, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

4.3.3.2. Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65 μm

Por razões metodológicas, decidimos analisar os resultados de Elispot estabelecendo como “cut-off” do leitor de Elispot o diâmetro de 65 μm , com a finalidade de eliminar a “reação de fundo” de spots pequenos, entre 45 e 65 μm , com aparentemente produção muito discreta de IFN- γ , e que eventualmente poderiam representar um certo grau de ativação intrínseca às várias etapas da técnica. Desta forma, analisando apenas spots com > 65 μm de diâmetro, houve como esperado uma diminuição na contagem de CFS. Compensatoriamente, diminuimos o limiar de positividade do ensaio, considerando-se então reação positiva a partir de 20 CFS por milhão de células. Com este protocolo de leitura observamos que, no grupo PPD+, todos os 19 indivíduos avaliados apresentavam mais de 20 CFS. No grupo TB-A dos 12 indivíduos, 9 (75%) apresentaram Elispot positivo. No grupo TB-C, dos 12 indivíduos 10 (83,3%) apresentaram positividade. Da mesma

por milhão de células). Não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados apesar de se observar aumento do número de spots de pacientes para curados e destes para indivíduos PPD+.

Figura10. Quantificação de CFS de IFN- γ , analisando CFS totais e CFS com diâmetro > 65 μ m, após estímulo com Esat-6, avaliados por Elispot nos grupos TB-A ($\bullet$, $n = 12$), TB-C ($\blacksquare$, $n = 12$) e PPD+ ($\blacktriangle$, $n = 19$)

4.3.5. Resultados da Resposta ao Antígeno 85B (Figura 11)

4.3.5.1. Análise de CFS com Spots Totais

No grupo PPD+, 9 de 19 de indivíduos (47,4%) apresentaram reatividade. No grupo TB-A em apenas um indivíduo dentre os doze testados (8,3%) apresentaram reatividade, enquanto no grupo TB-C 5 de 12 pacientes (41,7%) apresentaram reatividade. Pode-se observar novamente na figura aumento do número de spots de pacientes para curados e destes para indivíduos PPD+, porém sem significância estatística.

4.3.5.2. Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65mm

Apresentaram reatividade pelo Elispot 11 indivíduos (57,9%) no grupo PPD+, 4 (33,3%) no grupo TB-C, e 6 pacientes (50%) no grupo TB-A. Novamente, houve pequeno aumento da mediana do pacientes para curados e destes para indivíduos PPD+, porém sem apresentar significância estatística.

Figura 11. Produção de CFS de IFN- γ , analisando CFS totais e CFS com diâmetro > 65 μ m, após estímulo com 85B, nos grupos TB-A (•, $n = 12$); TB-C (◻, $n = 12$) e PPD+ (◄, $n = 19$). Não observamos diferenças significativas entre os grupos.

4.3.6. Resultados da Resposta ao Antígeno HBHA (Figura 12)

4.3.6.1. Análise de CFS com Spots Totais

As respostas ao HBHA foram em geral pobres, em consonância com os resultados anteriores de Elisa e linfoproliferação. No grupo PPD+ apenas 5 indivíduos (26,3%) apresentaram Elispot positivo; no grupo TB-A, 4 pacientes (33,3%) apresentaram reatividade, e no grupo TB-C 3 pacientes (25,0%) apresentaram reatividade. A análise estatística revelou não haver diferenças significativas entre os grupos.

4.3.6.2 Análise de CFS com Spots de Diâmetro Superior a 65mm

A avaliação dos spots por esta metodologia resultou em aumento de apenas 1 indivíduo no número de respondedores do grupo PPD+, de 5 para 6 (47,3%), e também não alterou os resultados dos outros dois grupos: 3 respondedores (25,0%) no grupo TB-A e 3 (25,0%) no grupo TB-C curada. Não houve diferenças significativas entre as medianas.

Figura 12. Produção de CFS de IFN- γ , analisando CFS totais e CFS > 65 μ m, após estímulo com antígeno HBHA, nos grupos TB-A (•, $n = 12$); TB-C (◻, $n = 12$) e PPD+ (◄, $n = 19$).

4.4. ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DO ELISPOT E DO ELISA PARA PRODUÇÃO DE IFN- γ E LINFOPROLIFERAÇÃO

4.4.1. Antígeno sonicado

De acordo com a tabela 9, observa-se que não houve correlação entre os resultados dos ensaios de Elispot e de Elisa ou linfoproliferação, quando utilizou-se como estímulo o antígeno sonicado.

Correlação		Elispot	Elispot 65
Elisa (n= 42)	<i>R</i>	0,01	0,11
	<i>P</i>	NS	NS
Cult. IE (n =38)	<i>R</i>	0,16	0,18
	<i>P</i>	NS	NS
Cult?cpm (n 38)	<i>R</i>	0,09	0,25
	<i>P</i>	NS	NS

Tabela 9. Correlação entre Elisa, linfoproliferação e Elispot (total e > 65 µm) em células estimuladas com antígeno sonicado

Mesmo entre os dois modos de avaliação do número de spots, encontramos uma correlação apenas mediana (Tabela 10).

		Elispot 65
El	<i>n</i>	42
ispot	<i>r</i>	0,64
	<i>p</i>	<0,0001

Tabela 10. Correlação entre Elispot (total e > 65 µm) em células estimuladas com antígeno sonicado

4.4.2. Antígeno ESAT-6

Conforme a tabela 11, observamos correlação apenas quando o Elispot levou em conta os spots maiores; mesmo assim, as correlações observadas foram fracas, sendo considerada apenas mediana ($r = 0,52$) entre Elispot 65 e linfoproliferação (?cpm).

		Elispot	Elispot 65
E lisa (n = 42)	<i>R</i>	0,16	0,38
	<i>P</i>	NS	0,0142
C ult. IE (n = 38)	<i>R</i>	0,076	0,43
	<i>P</i>	NS	0,0064
C ult. ?cpm (n=40)	<i>R</i>	0,18	0,52
	<i>P</i>	NS	0,0005

Tabela 11. Correlação entre Elisa, linfoproliferação e Elispot (total e > 65 µm) em células estimuladas com ESAT-6

Houve apenas fraca correlação entre os dois modos de se avaliar o número de spots.

		Elispot 65
El ispot	<i>N</i>	42
	<i>r</i>	0,48

	<i>p</i>	0,0012
--	----------	--------

Tabela 12. Correlação entre Elispot (total e > 65 µm)
em células estimuladas com ESAT-6

4.4.3. Antígeno 85B

Com este antígeno, não foi possível observar nenhuma correlação importante (tabela 13).

		Elispot	Elispot 65
Elisa (n = 41)	<i>R</i>	0,37	0,34
	<i>P</i>	0,016	0,03
Cult. IE (n = 38)	<i>R</i>	0,05	0,00
	<i>P</i>	NS	NS
Cult. ?cpm (n=38)	<i>R</i>	0,11	0,04
	<i>P</i>	NS	NS

Tabela 13. Correlação entre Elisa, linfoproliferação e Elispot (total e > 65 µm)
em células estimuladas com 85B

Houve apenas uma correlação mediana entre os dois modos de se avaliar o número de spots (tabela).

		Elispot 65
Elispot	<i>N</i>	42
	<i>R</i>	0,51

	<i>P</i>	0,0006
--	----------	---------------

Tabela 14 Correlação entre Elispot (total e > 65 µm)
em células estimuladas com com 85B

4.4.4. Antígeno HBHA

Com este antígeno, devido à baixa reatividade encontrada em todos ensaios, não observamos correlações entre o Elispot e as outras avaliações.

Considerando-se todas as comparações, incluindo os diferentes antígenos, podemos dizer que o Elispot pouco se correlacionou com as outras metodologias, ou seja, seus resultados poderia refletir um parâmetro imunológico que não se relacionaria nem à resposta proliferativa nem à dosagem de IFN-γ por Elisa convencional.

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS AOS ANTÍGENOS DE MTB DE ACORDO COM O MÉTODO EMPREGADO

4.5.1 Elisa para IFN-γ

Nos indivíduos PPD+, observamos que a produção de IFN-γ induzida por ESAT-6 e 85B se correlacionou fortemente ($r = 0.71$, $p = 0,007$) (fig. 13). De fato, considerando-se como resposta positiva ≥ 50 pg/ml, dos 19 indivíduos do grupo estimulados com ESAT-6 e antígeno 85B, houve 14 respostas concordantes: 11 indivíduos responderam para ambos antígenos enquanto apenas 3 não responderam para ambos.

Não se observaram correlações fortes ($r > 0,7$) ou mesmo medianas ($r > 0,5$) das respostas induzidas pelo antígeno sonicado em relação aos outros antígenos micobacterianos. O mesmo ocorreu na comparação do HBHA com os outros antígenos. É importante ressaltar que dos 20 indivíduos testados, 19 responderam ao antígeno sonicado, e destes apenas 11 responderam ao ESAT-6 e 15 ao 85-B, indicando que a reatividade ao sonicado nem sempre é preditiva de reatividade aos antígenos purificados.

No grupo TB-A, também se observou correlação somente entre 85-B e ESAT-6 ($r = 0,60$ e $p = 0,038$) (fig. 13). Apenas 2 pacientes produziram IFN- γ acima de 50 pg/ml com ESAT-6 e com 85B, mas apenas 1 paciente foi positivo para ambos antígenos. Como a concordância observada deveu-se em grande parte a não reatividade para ambos os antígenos, seu significado é bastante discutível.

A análise comparativa no grupo TB-C mostrou novamente forte correlação somente entre as respostas induzidas pelos antígenos ESAT-6 e 85B ($r = 0,73$ e $p = 0,0065$) sendo que dos 12 indivíduos testados, 9 responderam para ESAT-6 e 7 responderam para 85B, havendo concordância de resposta em 8 indivíduos (6 positivos e 2 negativos para ambos antígenos) (fig. 13).

Figura 13 Elisa para IFN- γ . Correlação entre as respostas para ESAT-6 e 85B no grupo PPD+ ($r = 0,71$; $p = 0,007$), no grupo TB-A ($r = 0,60$; $p = 0,038$) e no grupo TB-C ($r = 0,73$; $p = 0,0075$). Os resultados considerados positivos estão representados pelos pontos no quadrante acima e à direita, e os resultados concordantes negativos estão representados no quadrante abaixo e à esquerda. Desta forma, observa-se que a concordância entre 85B e Esat-6 nos pacientes TB-A e TB-C se deve mais a resultados concordantes negativos e no grupo PPD+ a resultados concordantes positivos.

4.5.2. Linfoproliferação por Índice de Estimulação (Figura 14)

Em relação à linfoproliferação medida por índice de estimulação, observamos que no grupo PPD+ houve uma correlação mediana entre as respostas induzidas por antígeno sonicado e ESAT-6 ($r = 0,65$ e $p = 0,0036$) (fig. 14). Considerando-se uma resposta positiva aquelas em que o índice de proliferação é superior a 2,0, dos 18 indivíduos do grupo houve coincidência da resposta em 15, pois em todos houve reatividade ao sonicado e em 15 houve reatividade ao ESAT-6. Verificamos uma forte correlação ($r = 0,74$ e $p = 0,0005$) entre a reatividade a antígeno sonicado e 85B: houve reatividade positiva para 85B em 14 indivíduos (fig. 14). Quando comparados os antígenos ESAT-6 e 85B verificamos uma correlação mediana ($r = 0,56$ e $p = 0,017$), apesar de haver boa concordância de resultados: 15 dos 18 indivíduos concordantes, 13 positivos e 2 negativos para ambos antígenos.

No grupo TB-A houve apenas uma forte correlação, entre as respostas induzidas por ESAT-6 e HBHA ($r = 0,75$; $p = 0,012$), que se deveu à concomitante baixa reatividade para ambos antígenos (concordância em 8 dos 12 pacientes com apenas 3 respostas positivas e 5 respostas negativas para ambos antígenos).

No grupo TB-C observamos também forte correlação entre as respostas ao ESAT-6 e 85B ($r = 0,97$; $p < 0,0001$), havendo concordância em 11 dos 12 pacientes do grupo (6 positivos e 5 negativos para ambos antígenos).

Figura 14 Correlação entre antígeno sonicado e 85B para o grupo PPD+ com $r = 0,74$; $p = 0,0005$; ESAT-6 e HBHA no grupo TB-A com $r = 0,75$; $p = 0,012$

4.5.3 Linfoproliferação por ?cpm

Em relação à linfoproliferação medida por ?cpm, observamos que no grupo PPD+ não houve correlações com $r > 0,5$ entre as respostas aos 4 antígenos estudados. Todos os 18 indivíduos testados responderam (?CPM > 1000) ao antígeno sonicado, enquanto apenas 9 responderam ao ESAT-6, 14 ao 85B, e ao HBHA apenas 3. Comparando-se as respostas ao ESAT-6 e 85B, observamos 7 indivíduos com resposta positivas concordantes e 2 com respostas negativas concordantes, isto é, dos 9 que responderam ao ESAT-6, 7 também responderam ao 85B. Entretanto, dos 14 que responderam ao 85B, apenas 7 responderam ao ESAT-6.

No grupo TB-A, observamos que houve correlação da resposta ao ESAT-6 com a resposta a 85B ($r = 0,73$; $p = 0,017$) e a HBHA ($r = 0,76$; $p = 0,011$), e deste com 85B ($r = 0,66$; $p = 0,037$), porém estas concordâncias se deram pela predominância de respostas negativas para os 3 antígenos purificados neste grupo. Não houve correlação entre a resposta a estes mesmos antígenos e ao antígeno sonicado, pois houve resposta positiva ao sonicado em 7 pacientes, salientando a disparidade entre a resposta ao antígeno complexo e a resposta aos antígenos purificados por este ensaio.

No grupo TB-C, observamos que houve forte correlação às respostas induzidas pelo ESAT-6 e 85B ($r = 0,94$; $p < 0,0001$), com concordância em 9 dos 12 indivíduos do grupo, porém, novamente, devido aos resultados negativos: 7 negativos e apenas 2 resultados positivos concordantes. Da mesma forma que nos grupos anteriores, a resposta ao antígeno sonicado foi freqüente, 11 de 12 pacientes, que, entretanto, não se traduziu em reatividade aos antígenos purificados.

4.5.4. Elispot para IFN- γ (Spots Totais)

Considerando-se como positivas respostas superiores a 50 CFS por 1 milhão de PBMC, já descontados os spots das células não estimuladas, os resultados com antígeno sonicado no grupo PPD+ mostraram forte correlação com ESAT-6 ($r = 0,76$; $p = 0,0001$, porém apenas 11 dos 19 indivíduos foram concordantes: 10 com resultados positivos e 1 negativo, e 7 dos 18 indivíduos que responderam ao sonicado não responderam ao ESAT-6) (fig. 12) e correlação mediana com a resposta ao 85B ($r = 0,63$, $p = 0,0038$, 10 indivíduos concordantes: 9 com respostas positivas e 1 negativa, sendo que 9 dos 18 indivíduos que responderam ao sonicado não responderam ao 85B). Da mesma forma, houve correlação entre o antígeno sonicado e o HBHA ($r = 0,57$; $p = 0,0105$, porém apenas 6 indivíduos concordantes, 5 com respostas positivas e 1 negativa).

Quando avaliamos a resposta para o ESAT-6, observamos correlação com a resposta ao 85B ($r = 0,69$; $p = 0,0011$) com 16 resultados concordantes em 19 indivíduos, porém com a contribuição de 8 resultados negativos concordantes (e 8 positivos), e forte correlação com HBHA ($r = 0,75$; $p = 0,0002$), com 14 indivíduos concordantes (porém 9 com resultados concordantes negativos e

apenas 5 positivos). A resposta frente ao antígeno 85B mostrou correlação moderada com HBHA ($r = 0,55$; $p = 0,0153$), com 11 indivíduos concordantes em 19 (porém com 8 respostas negativas e apenas 3 positivas). Desta forma as concordâncias que observamos neste grupo com esta metodologia têm relevância apenas relativa pelo grande número de resultados negativos para os antígenos purificados.

No grupo TB-A, observamos forte correlação apenas entre a resposta induzida pelo ESAT-6 e 85B ($r=0,76$; $p=0,0044$), devido também à predominância de resultados negativos (resultados concordantes em 10 dos 12 pacientes, sendo 1 positivo e 9 negativos). Da mesma forma, no grupo TB-C observamos forte correlação entre as respostas induzidas por ESAT-6 e 85B ($r=0,98$; $p<0,0001$), com concordância em 9 dos 12 pacientes do grupo (porém 7 negativos e apenas 2 positivos).

Assim, correlações entre as respostas aos antígenos foram freqüentemente observadas usando o Elispot, porém com relevância limitada pelo fato de boa parte das concordâncias de resultados serem de respostas negativas para os antígenos. Entre 85B e ESAT-6, entretanto, em diversas ocasiões, especialmente no grupo PPD+, pudemos observar correlações expressivas, com a maioria dos resultados concordantes positivos.

Figura 15. Correlação entre antígeno sonicado e ESAT-6 para o grupo PPD+ com $r = 0,76$; $p = 0,0001$; ESAT-6 e HBHA com $r = 0,75$; $p = 0,0002$; no grupo TB-A e entre ESAT-6 e 85B com $r = 0,76$; $p = 0,0044$ e no grupo TB-C a correlação entre ESAT-6 e 85B com $r = 0,98$ e $p < 0,0001$

4.5.5. Elispot para IFN- γ com Spots de Diâmetro Superior a 65 mm

A análise das respostas aos diferentes antígenos no grupo PPD+ revelou ausência de correlação com $r > 0,5$ entre as mesmas. Todos os 19 indivíduos tiveram resposta positiva ao antígeno sonicado, porém destes somente 10 com resposta positiva para ESAT-6, 11 com resposta positiva para 85-B, e 7 com resposta positiva concomitante para HBHA.

No grupo TB-A, observamos forte correlação da resposta ao antígeno sonicado com a resposta ao ESAT-6 ($r = 0,74$; $p = 0,0063$), com 8 concordâncias em 12 pacientes (5 positivos e 3 negativos) (fig.13), e forte correlação com a resposta ao antígeno 85B ($r = 0,79$; $p = 0,0019$), com 7 concordâncias (4 positivos e 3 negativos). A resposta ao ESAT-6 se correlacionou ainda com a resposta ao 85B ($r = 0,93$; $p < 0,0001$), com 11 concordantes em 12 pacientes, porém provavelmente relacionada ao alto índice de respostas negativas (4 positivas e 7 negativas).

No grupo TB-C, verificamos uma forte correlação da resposta ao antígeno sonicado com a resposta ao ESAT-6 ($r = 0,70$; $p = 0,0102$), porém apenas 6 resultados concordantes em 12 pacientes (4 positivos e 2 negativos) e fraca correlação com a resposta ao 85B ($r = 0,59$ e $p = 0,041$), com 8 concordâncias (6 positivos e 2 negativos,). A resposta ao ESAT-6 correlacionou-se apenas com a resposta ao 85B ($r = 0,90$; $p < 0,0001$), com 8 concordâncias em 12 pacientes (3 positivos e 5 negativos).

Aqui vale também a ressalva feita acima, pelo grande número de resultados negativos aos antígenos purificados.

4.6. PRODUÇÃO DE IL-10 APÓS ESTÍMULO COM O MITÓGENO PHA E ANTÍGENOS DE MTB

Tendo em vista a importância da IL-10 na patogenia da TB, como citocina imunossupressora (TURNER, J.; et al.,2002), resolvemos paralelamente avaliar a produção de IL-10 em resposta aos antígenos dos 3 grupos de indivíduos utilizando 2 metodologias, Elisa no sobrenadante de culturas e Elispot.

4.6.1. Análise por Elisa

4.6.1.1. Análise da Proliferação Espontânea de IL-10 por Elisa (Figura 16)

Verificamos a produção de IL-10 espontâneas (sem estímulo) nos sobrenadantes, e obtivemos os seguintes medianas: para o grupo TB-A , 10 pg/ml; TB-C, 4,0 pg/ml, e no grupo PPD+, 11 pg/ml. Não houve diferenças estatísticas entre eles.

Analisando-se a produção de IL-10 após estímulo com antígeno sonificado, ESAT-6, 85B e HBHA, verificamos que houve predomínio de discreta produção para todos os estímulos antigênicos, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Figura 17. Produção de IL-10 frente a antígenos específicos nos grupos TB-A (●, $n = 12$); TB-C (■, $n = 11$) e PPD+ (▲, $n = 20$). Não houve diferenças estatisticamente significantes.

4.6.2. Análise por Elispot

4.6.2.1. Análise da produção Espontânea de IL-10 por Elispot (Figura 18)

Verificamos as seguintes medianas de CFS espontâneas (por 1 milhão de células): TB-A, 525 CFS; TB-C, 1915 CFS; e PPD+, 943 CFS, sem diferença estatística entre eles.

Figura 18- Mediana da contagem de CFS para IL-10 espontâneas nos grupos TB-A (•, $n = 10$); TB-C (◻, $n = 12$) e grupo PPD+ (◴, $n = 19$).

4.6.2.2. Análise da produção de IL-10 Frente aos Antígenos Específicos (Figura 19) por Elispot

Analisando-se a produção de IL-10 por Elispot após estímulo com antígeno sonificado, ESAT-6, 85B e HBHA, verificamos que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com todos os antígenos

Figura 19. Contagem de CFS de IL-10 frente a antígenos específicos nos grupos TB-A (●, $n = 10$); TB-C (■, $n = 12$) e PPD+ (▲, $n = 18$)

4.6.3. Correlação Entre os Números de CFS para IL-10 por Elispot na Resposta aos Antígenos nos Grupos Estudados.

4.6.3.1. Grupo PPD+

No grupo PPD+, observamos forte correlação da resposta ao antígeno sonicado com a resposta ao ESAT-6, com $r = 0,75$ e $p = 0,0002$, e com a resposta ao 85B, com $r = 0,74$ e $p = 0,0003$; já com HBHA, a correlação foi menos marcante, com $r = 0,60$ e $p = 0,0062$. A comparação entre o ESAT-6 e o 85B nos mostra também uma forte correlação ($r = 0,92$ e $p < 0,0001$). As correlações fortes estão ilustradas na figura 20.

Figura 20. Correlação da resposta ao antígeno sonicado com ESAT-6 ($r = 0,75$; $p = 0,0002$), 85B ($r = 0,74$; $p = 0,0003$) e HBHA ($r = 0,60$; $p = 0,0062$). Forte correlação entre as respostas a ESAT-6 e 85B ($r = 0,92$; $p < 0,0001$).

4.6.3.2. Grupo TB-A (Figura 21)

No grupo TB-A, observamos correlação apenas entre a resposta ao antígeno sonicado e 85B, com $r = 0,78$ e $p = 0,0105$.

Neste grupo observamos forte correlação da resposta ao antígeno sonicado com ESAT-6 ($r = 0,91$ e $p < 0,0001$) e 85B ($r = 0,92$ e $p < 0,0001$). Observamos também forte correlação entre as respostas a ESAT-6 e 85B, com $r = 0,92$ e $p < 0,0001$.

Figura 22. Correlação entre antígeno sonicado e ESAT-6 ($n = 12$) com $r = 0,91$; $p < 0,0001$; 85B ($r = 0,92$; $p < 0,0001$) e entre ESAT-6 e 85B ($r = 0,92$; $p < 0,0001$) para o grupo TB-C avaliado por Elispot

5. DISCUSSÃO

A Tuberculose é uma doença crônica granulomatosa de alta incidência no Brasil caracterizada por um déficit de imunidade predominantemente antígeno- específico do hospedeiro, da qual um balanço alterado de citocinas participa ativamente. O Brasil encontra-se atualmente na 15^a. posição entre os países com maior incidência da doença, com uma estimativa de 68 casos /100.000 habitantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No presente estudo objetivamos avaliar a resposta imune celular dos pacientes por meio da análise da ativação das células mononucleares do sangue periférico frente a 4 diferentes antígenos derivados do MTb, um complexo, antígeno sonicado, e 3 purificados, ESAT-6, antígeno 85B e HBHA, todos descritos na literatura como antígenos largamente reconhecidos por células de indivíduos infectados pelo MTb, e com provável participação na resposta imune de pacientes in vivo.

Até aonde vai o nosso conhecimento, um estudo simultâneo destes 3 antígenos ainda não foi reportado na literatura.

Para tal, utilizamos dois métodos para mensuração da produção de IFN- γ e IL-10, o Elispot e o Elisa do sobrenadante de cultura de PBMC. Além destes, procuramos também avaliar a resposta proliferativa.

Tanto a resposta proliferativa como o Elisa para dosagens em sobrenadantes de cultura já estão amplamente padronizados em nosso

laboratório e são utilizados na rotina de avaliação imunodiagnóstica de pacientes. Entretanto, a busca de novas vacinas têm conduzido à questão de se definir o método de escolha para avaliação da resposta (ou ausência desta) vacinal. Como hoje existe vários métodos disponíveis, ficando difícil a utilização de todos em pesquisas de campo, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, para os quais a demanda de vacinas é mais premente, a literatura tem sistematicamente discutido esta questão e, na última década tem sido proposta (ou utilizada) a técnica de Elispot como método de escolha (MAECKER & MAINO, 2003).

Esta técnica, ao quantificar o número de células produtoras de citocinas a partir de células do sangue periférico, em tempo rápido (< 24 horas a poucos dias) (BENNOUNA et al., 2002) e utilizando tecnologia relativamente simples, tem sido sistematicamente utilizada em estudos de resposta vacinal. Entretanto, mais recentemente, alguns questionamentos sobre seu real papel têm sido levantados. Entre os quais, a necessidade do uso de equipamentos automatizados de leitura, com a finalidade de se reduzir a subjetividade da contagem visual, que discutiremos mais adiante

Por essas razões resolvemos introduzir o Elispot em nossa rotina laboratorial. Para comparar os resultados de Elispot com os de proliferação e de Elisa, decidimos primeiro analisar o comportamento destas últimas, com as quais já temos familiaridade. Adicionalmente, comparamos os dois métodos de se avaliar a resposta proliferativa

(?cpm e IE), tendo em vista que os dois são amplamente e alternativamente utilizados na literatura, havendo certo debate em relação a qual expressaria mais fidedignamente o resultado do ensaio. Pudemos observar que, para um mesmo grupo de indivíduos, os resultados de Elisa para IFN- γ não se correlacionavam consistentemente com os resultados de proliferação, tanto por ?cpm como por IE, na resposta aos antígenos, com exceção da resposta ao ESAT-6, em que houve correlação apenas mediana. Os resultados de proliferação, por outro lado, apresentaram uma forte correlação. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de analisarem parâmetros diferentes, resultantes da participação de elementos celulares distintos. Em relação à resposta proliferativa, é relatado que esta resulta principalmente da capacidade proliferativa de células T CD4+, que secretam ativa e autocrinamente IL-2, em quantidades geralmente maiores que células T CD8 naíves (CLERICE et al., 1993).

Paralelamente, células T CD8+ totais apresentam menor capacidade proliferativa (von BAER et al., 2001). Entre as possíveis causas está o fato de que porcentagens significativas destas células circulantes no sangue periférico de indivíduos saudáveis (e em porcentagens ainda maiores em várias condições patológicas ou com o envelhecimento) não expressam a molécula co-estimulatória CD28 (AROSA et al., 2002). Células T CD8+28- apresentam supressão da capacidade de resposta proliferativa. Desta forma, a resposta

proliferativa estaria mais relacionada à participação das células CD4+ do que das células CD8+. A origem celular da produção de IFN- γ na Tuberculose tem sido recentemente revista na literatura, e inicialmente relacionada predominantemente às células CD4+. A partir dos estudos de SHAMS ET AL.(2001), LALVANI ET AL. (1998) e MASUNGI (2002), e mais recentemente segundo ANTAS ET AL. (2004), passou a ser igualmente dividida entre células CD4 e CD8. É possível então que a discrepância entre os resultados de IFN- γ e proliferação possa ser creditadas à participação de elementos celulares distintos em cada uma das respostas.

Tanto pelos ensaios de linfoproliferação como pela produção de IFN- γ , notamos que houve de forma geral tendência à diminuição da resposta dos pacientes aos vários antígenos em relação aos controles PPD+. Vários estudos relacionam a maior capacidade de secreção de IFN- γ por células de indivíduos saudáveis infectados quando comparados aos pacientes com doença ativa, principalmente naqueles com doença mais grave (PATHAN et al., 2001, ULRICH et al., 2000, VEKEMANS et al., 2001, MOURA et al., 2004, & BHATTACHARYYA et al., 1999). Da mesma forma, vários estudos evidenciaram que linfócitos de pacientes proliferam menos quando estimulados com antígenos do que controles reatores ao PPD (PEREIRA et al., 2004, SURCEL et al., 1994 & SANCHEZ et al., 1994).

Os resultados com antígeno sonicado, ESAT-6, e 85B aqui apresentados mostram, em geral, diferenças significativas entre os pacientes e os controles PPD+, com os indivíduos curados apresentando resultados intermediários. Exceção a esta observação, as respostas ao HBHA, foram em geral baixas, independente do grupo estudado, o que pode sugerir perda parcial da atividade biológica do antígeno durante o transporte, ou utilização de concentração sub-ótima, pois resultados prévios da literatura indicam que cerca de 60% dos controles PPD+ respondem a este antígeno com intensa resposta proliferativa e produção de IFN- γ . Convém esclarecer que a concentração usada foi a mesma que MASUNGI et al. (2002), tendo sido utilizada em ensaios preliminares para a padronização do Elispot, com boa formação de *spots*.

É importante ressaltar que, como em achados de outros autores, não observamos diminuição da resposta proliferativa ao mitógeno PHA nos pacientes em relação aos indivíduos PPD+, indicando que o déficit imunológico na Tuberculose é predominantemente antígeno-específico, mesmo nos pacientes relativamente graves recrutados por nós (muitos deles internados).

Em nossos estudos, encontramos resultados semelhantes aos de outros autores, como exemplo os de VEKEMANS et al. (2001) & MUSTAFA et al. (1998), em que a quantidade de IFN- γ liberada, assim como a intensidade da resposta proliferativa, foram sempre mais

exuberantes na resposta ao antígeno complexo sonicado, comparativamente aos antígenos purificados, sugerindo que múltiplos antígenos devem ser reconhecidos pela resposta imune do hospedeiro na Tuberculose.

CARDOSO et al. (2002), ao estudar indivíduos brasileiros vacinados pelo BCG e reatores ao PPD, mostraram que apenas parte destes indivíduos produziam IFN- γ em resposta ao ESAT-6 e sugeriram que, em nosso meio, somente aqueles indivíduos que respondem positivamente ao ESAT-6 estariam infectados pelo MTb, enquanto que nos demais a presença de teste cutâneo positivo para o PPD seria decorrente, ou de prévia vacinação com o BCG, ou de infecção prévia por outra(s) micobactéria(s) não-*tuberculosis*, mais provavelmente de origem ambiental ou saprófita(s) (HUEBNER et al., 1993). Portanto, poderíamos re-classificar os indivíduos PPD+ deste estudo sem produção de IFN- γ com o ESAT-6, como um sub-grupo denominado PPD+ESAT-6-, portanto não infectado pelo MTb. Esse fato também se justifica por outros estudos, com casuísticas de outros países, sugerindo que a resposta ao ESAT-6 tem alto valor preditivo para diferenciar indivíduos infectados de não infectados pelo MTb (RAVN et al, 1999; LALVANI et al., 2001 & DOHERTY et al., 2002). Nossos resultados do grupo de curados estão de acordo com esta proposta, pois os mesmos apresentaram produção de IFN- γ com ESAT-6 mais intensa que a dos indivíduos PPD+ (fig. 6), e, entre estes últimos,

poderíamos distinguir nitidamente dois comportamentos: 11 que responderam com produção maior que 50 pg/mL, e 9 com produção menor que 50 pg/mL: os primeiros seriam de fato aqueles infectados pelo MTb, como os pacientes curados.

Neste sentido, nos indivíduos PPD+ a produção de IFN- γ induzida por ESAT-6 e por 85B se correlacionou fortemente, sendo que observamos boa concordância entre as respostas quando utilizou-se o critério de respostas positivas e negativas, provavelmente sugerindo que não somente a resposta ao ESAT-6, mas também a resposta ao 85B esteja relacionada à infecção pelo MTb, e não à infecção por outra micobactéria.

Parte importante deste projeto foi dedicada à implantação do Elispot, a qual demandou considerável esforço de nossa parte. Para a quantificação de IFN- γ , obtivemos bons resultados sem maiores dificuldades, o que não ocorreu com a IL-10, onde tivemos que recorrer aos reagentes e placas já comercialmente disponíveis, com as recomendações de uso pré-estabelecidas. Os resultados obtidos no final da etapa de padronização foram felizmente satisfatórios, pela qualidade dos *spots* formados e relativamente discreta coloração de fundo, facilitando a visualização e contagem, sendo comparáveis aos da literatura.

Entretanto a avaliação dos resultados para IFN- γ dos 3 grupos de indivíduos com esta metodologia, diferentemente da resposta

proliferativa e da dosagem de IFN- γ por Elisa, não revelou diferenças significativas entre esses métodos com uso de qualquer dos antígenos estimuladores.

Observamos apenas uma tendência a um maior número de células produtoras nos indivíduos PPD+ e, para nossa surpresa, nos curados, em que esperávamos números consideráveis de CFS, 10 dos 12 pacientes avaliados não exibiram respostas positivas. Devemos ressaltar que em vários pacientes ou indivíduos observamos número relativamente alto de CFS “espontâneas”. Não podemos atribuir este resultado à metodologia inadequada ou erro técnico, pois muitos outros pacientes ou indivíduos apresentavam “basais” muito baixos. Em uma ou outra ocasião em que houve “basal” alto, o ensaio foi repetido com células congeladas e confirmado o resultado.

Havia grande variabilidade no tamanho dos *spots* para IFN- γ , e notamos um grande número de *spots* pequenos, que provavelmente representam células produtoras de quantidades muito limitadas da citocina, e eventualmente resultantes de algum grau de ativação inespecífica, intrínseca às várias etapas de manipulação das células.

Da mesma forma que nos ensaios anteriores, procuramos correlacionar os resultados do Elispot com as outras avaliações imunológicas.

Estas tentativas de correlação revelaram ausência de concordância do Elispot com a resposta proliferativa ou com os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes. Diante desta constatação procuramos

então reavaliar nossa leitura dos Elispots, tentando eliminar a possível “interferência” de *spots* menores nas contagens, hipotetizando que os mesmos, pouco contribuiriam para a produção total de IFN- γ .

Os resultados do Elispot levando em conta apenas *spots* maiores que 65 μ m de diâmetro, de fato resultou em “basais” menores, porém não alterou significativamente a análise dos resultados de Elispot.

Esta metodologia persistiu não distinguindo significativamente os 3 grupos de indivíduos. Além disso, não encontramos correlação estreita entre as duas formas de leitura da reação, com no máximo r de 0,6, nem houve melhora na correlação entre os resultados de Elispot com leitura de *spots* > 65 μ m de diâmetro e as outras avaliações imunológicas.

Ainda em relação ao Elispot, ressalta-se que há na literatura importante discussão a respeito de seu significado e importância. Tem se observado mais recentemente a ausência de correlação entre resposta vacinal protetora, avaliada por outros parâmetros, clínicos inclusive, e o resultado do Elispot (FLANAGAN et al. 2001 & REECE et al. 2004.). Duas formas principais de Elispot são descritas, Elispot *ex-vivo* e de cultura (“culture Elispot”). No primeiro as células isoladas do sangue periférico são diretamente aplicadas à placa de Elispot e estimuladas por até 24 hs, o que permitiria quantificar *ex-vivo* as células T CD4 ou T CD8 efectoras (GODKIN et al. 2002). No segundo, as células são reestimuladas *in vitro*, por vários (7 ou mais) dias, em

culturas convencionais na presença dos estímulos antigênicos ou mitogênicos, re-isoladas e então aplicadas à placa de Elispot por várias horas na presença do estímulo (GODKIN et al. 2002). Por esta metodologia, seriam avaliadas primordialmente a subpopulação de células de memória central, as quais têm sido consideradas cruciais na constituição de respostas vacinais protetoras, enquanto a proteção conferida pelas células efectoras seria apenas temporária (REECE et al. 2004).

Por nossa metodologia, em que estimulamos as células diretamente na placa de Elispot por 72 horas (48 horas para IL-10), é provável que estejamos avaliando células de memória, reestimuladas *in vitro*, da mesma forma que em vários estudos relatados na literatura em tuberculose (SHAMS et al., 2001 & FLANAGAN et al., 2001). A duração do período de incubação das culturas, de 72 até 120 hs, para determinação da produção de IFN- γ nos sobrenadantes por Elisa foi estabelecida em nosso laboratório em estudos prévios com antígenos complexos ou purificados (VASCONCELOS et al. 2001, BENARD et al, 1997 & ROMANO et al., 2002), sempre com resultados satisfatórios, que se confirmaram neste estudo para o Elisa porém não para o Elispot.

É possível explicar a falta de correlação entre dosagem de IFN- γ por Elispot e a resposta proliferativa, pelas mesma considerações feitas anteriormente, em relação ao Elisa convencional a respeito das

células envolvidas em cada uma das respostas. ANTAS et al. (2004) & SHAMS et al. (2001) mostraram que tanto por Elispot como por citometria intracelular que células T CD4+ e CD8+ são co-responsáveis pela produção de IFN- γ . SHAMS et al. (2001) verificaram adicionalmente que a secreção mediada por células T CD8+ era dependente de T CD4+, pois depleção desta última abolia completamente a secreção de IFN- γ , sendo que o inverso não era verdadeiro: a depleção de células CD8+ apenas parcialmente inibia a secreção de IFN- γ .

Em outra condição infecciosa, como a infecção por citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, que também tem sido estudada em nosso laboratório, pudemos verificar ausência de correlação entre a produção de IFN- γ (neste modelo mediada essencialmente por linfócitos CD8+) e a resposta linfoproliferativa, essencialmente mediada por células T CD4+ (MENDES et al., 2002). Neste mesmo modelo, outros grupos também notaram que produção de IFN- γ e linfoproliferação eram respostas desconexas (LJUNGMANN et al., 1986 & BORYSIEWICZ et al., 1983).

Diferentemente da maioria dos estudos de imunidade celular, que em geral incluem pacientes com diferentes apresentações clínicas da TB, indivíduos PPD+ (controles positivos) e indivíduos não expostos (controles negativos), em nosso estudo avaliamos também indivíduos curados de tuberculose.

RODRIGUES et al. (2002) reportaram que pacientes recém-tratados persistiam com alterações de suas subpopulações celulares, marcadamente diminuição do número de células CD8+ circulantes, comparados com indivíduos PPD.. Estudos da resposta imune celular de pacientes com tratamento bem sucedido são escassos. UMA et al. (1999) demonstraram forte recuperação da resposta proliferativa em comparação com os mesmos pacientes pré-tratamento, enquanto MOURA et al. (2004) evidenciaram recuperação da capacidade de secretar IFN- γ pós-tratamento imediato. Entretanto, HIRSCH et al. (1999) estudaram longitudinalmente a resposta de IFN- γ de pacientes de Uganda sob tratamento, e observaram que esta só atingia valores próximos dos normais após 18 meses do início do tratamento (os pacientes foram tratados por 6 meses com até 4 drogas tuberculostáticas), estando significativamente diminuída ainda aos 12 meses.

Apesar da limitação de termos avaliado pacientes com diferentes períodos pós-tratamento, nossos resultados também permitem sugerir uma recuperação incompleta da resposta imune com o tratamento, tendo em vista que, para vários dos parâmetros analisados a mediana do grupo curado estava nitidamente inferior a dos indivíduos PPD+, apesar destas diferenças nem sempre alcançarem significância estatística. Um dos argumentos mais utilizados para explicar a hiporreatividade de pacientes com Tuberculose é a hipótese de

seqüestro das células T respondedoras para os sítios de infecção, restringido seu número no sangue periférico (HIRSCH et al., 1999). Entretanto a persistência de hiporreatividade ao longo do tratamento, quando em princípio haveria diminuição do seqüestro de células para os sítios inflamatórios, ou eventualmente células seqüestradas poderiam voltar a recircular, corrobora para a noção de que este não seja o principal mecanismo envolvido na hiporreatividade.

Uma das possibilidades levantada por nós é a de que haveria uma diminuição do repertório de células T respondedoras aos antígenos circulantes após o tratamento, em comparação com os indivíduos PPD+. Esses, apesar de clinicamente saudáveis, têm uma infecção persistente, sub-clínica, que provavelmente leva à pequena, porém persistente exposição aos antígenos micobacterianos pelo hospedeiro. Já o tratamento da TB é considerado curativo em 98% dos casos, se realizado com boa adesão do paciente, o que levaria a completa eliminação dos bacilos, e interrupção da exposição e “priming” do sistema imune do hospedeiro por antígenos bacterianos. De fato, ANSAR et al. 2001, demonstraram queda no número de células T CD4+ circulantes, produtoras de IFN- γ específicas para ESAT-6, ao longo do tratamento em todos os pacientes, independentemente da gravidade da doença.

Ainda em relação à imunopatogenia da TB, é indiscutível o papel imunossupressor representado pela IL-10 (PEREIRA et al., 2004 &

AWOMOYI et al., 2002) . Entretanto, alguns estudos não detectaram níveis aumentados de secreção desta citocina por PBMC de pacientes com TB ativa em resposta a antígenos micobacterianos (ZHANG et al., 1995 & McDYER et al., 1997). Nossos resultados de dosagem de IL-10 nos sobrenadantes de cultura revelaram na maioria dos indivíduos e pacientes testados níveis inesperadamente baixos. Uma das possíveis explicações pode ser o fato de termos coletado o sobrenadante das culturas utilizadas para Elispot, que continham 1×10^5 PBMC por cavidade, quando normalmente nossos ensaios para análise de IL-10 são realizados em culturas de 2×10^5 PBMC por cavidade. Esta menor densidade de células pode ter afetado significativamente a concentração de IL-10 liberada nos sobrenadantes de cultura.

Por outro lado, os resultados de quantificação de CFS para IL-10 foram notadamente positivos (Fig. 2), com rica formação de *spots* e expressivas correlações entre as respostas induzidas por antígeno sonicado, ESAT-6 e 85B. Entretanto, mesmo nestas condições, não se observou diferença significativa entre os grupos, reproduzindo os resultados de alguns autores (ZHANG et al., 1995 & McDYER et al., 1997).

Desta forma, nossos resultados confirmam dados prévios que demonstram a diminuição da capacidade proliferativa e da produção de INF- γ em pacientes com tuberculose. Tanto a dosagem de IFN- γ nos

sobrenadantes de cultura como a medida da resposta linfoproliferativa, esta última aparentemente sem diferença marcante se avaliada por γ cpm ou IE, permanecem como parâmetros imunológicos consistentes. A implantação do Elispot em nosso laboratório, até o momento, não resultou em melhor qualidade na avaliação da resposta imune. Esta metodologia, em que pese sua atual indicação como método de escolha para avaliação de resposta vacinal (REECE et al., 2004 & MAECKER and MAINO, 2003), vem sofrendo algumas críticas. Além de necessitar de maior sofisticação laboratorial que o Elisa convencional (p. ex, leitor de Elispot), implica em custos mais elevados, representados pela aquisição do referido equipamento, de alto custo, e das placas, consideravelmente mais caras que as de Elisa. Estas observações nos fazem repensar sobre a eleição do Elispot como método de escolha para a rotina de avaliação de protocolos vacinais, pelo menos para as nossas condições laboratoriais. Considerações semelhantes foram recentemente feitas no último Congresso Mundial de Vacinas em AIDS, realizado em Lausanne, Suíça, em outubro 2004 (Apud Luís Brígido, Assessoria Técnica em Vacinas, Programa Nacional em DST-AIDS, Ministério da Saúde, Brasil)

6. CONCLUSÕES

- Nossos achados tendem diminuir a resposta linfoproliferativa da produção de IFN- γ aos vários antígenos, porém não à PHA, nos pacientes em relação aos indivíduos PPD+, confirmando dados da literatura, indicando hiporreatividade específica nos pacientes com tuberculose
- As correlações entre os resultados de linfoproliferação e dosagem de IFN- γ foram apenas parciais, e devem refletir diferentes contribuições de diferentes subpopulações celulares para cada resposta. Houve boa, porém não total concordância, entre a avaliação da resposta proliferativa por 3 Hcpm e por IE, sugerindo que os dois modos são válidos porém não necessariamente intercambiáveis, para avaliação da resposta proliferativa
- A maior reatividade ao antígeno sonificado que aos antígenos purificados indica a complexidade da resposta imune na tuberculose, provavelmente dirigida a uma multiplicidade de antígenos, não se podendo definir um antígeno imunodominante.
- As respostas aos antígenos purificados ESAT-6 e 85B se revelaram mais intensas e significantes que ao HBHA, eventualmente por razões metodológicas, como perda da atividade biológica deste último antígeno ou utilização de dose sub-ótima. Mais estudos são necessários para se avaliar a utilidade do HBHA na investigação da resposta imune de pacientes com tuberculose de nosso meio.
- O Elispot não foi capaz de diferenciar os resultados dos pacientes com tuberculose ativa dos resultados dos pacientes com tuberculose curada ou dos resultados dos indivíduos PPD+, denotando provavelmente uma menor sensibilidade do Elispot estabelecido por nós neste estudo, em comparação às técnicas de linfoproliferação e Elisa convencional
- As dosagens de IL-10 por Elisa e Elispot não revelaram diferenças entre os grupos para quaisquer dos antígenos utilizados, sendo que o Elispot se mostrou aparentemente mais sensível que o Elisa nas condições estabelecidas para este estudo
- Nossos resultados sugerem que métodos "clássicos", e já estabelecidos em nossa rotina de imunodiagnóstico, como linfoproliferação e Elisa, persistem válidos para se avaliar a imunidade celular, e que em nossas condições laboratoriais, a técnica de Elispot não representou, até o momento, uma melhora na qualidade da avaliação imunológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBECH, D.; RAVN, P.; OLOBO, J.; DOHERTY, T. M.; EGUALE, T.; GELETU, M.; HAILU, W.; ANDERSEN, P.; BRITTON, S. T-Cell Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Fractions in Tuberculosis Patients and Their Household Contacts. **Infect. Immun.**, v.7(11),p.5967-71,1999.

ANDERSEN, P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. **Infect. Immun.** v.62,p.2536-44, 1994.

ANTAS PR, SALES JS, PEREIRA KC, OLIVEIRA EB, CUNHA KS, SARNO EN, SAMPAIO EP. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Braz. J. Med. Biol.Res.** v.37(8), p.1119-29, 2004

AROSA, F. A. CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. **Immun. Cell. Biol.**v.80,p.1-13,2002

AWOMOYI AA, MARCHANT A, HOWSON JM, MCADAM KP, BLACKWELL JM, NEWPORT MJ. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. **J. Infect. Dis.** v.186(12),p.1808-14, 2002

BEIGELMAN, C.; SELLAMI D.; BRAUNER, M. CT of parenchymal and bronchial tuberculosis. **Eur. Radiol.**, v. 10 (5), p. 699-709, 2000.

BELISLE, J.T.; VISSA, V.D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P. J.; BASRA, G. S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biosynthesis. **Science**, v. 276, p. 1420-2, 1997.

BENARD G.; ORII, N.M.; MARQUES, H.H.S.; MENDONÇA, M.; AQUINO, M.Z.; CAMPEAS, A.E.; DeI NEGRO, G.M.B.; DURANDY, A.; DUARTE, A.J.S. Acute severe paracoccidioidomycosis in children. **J. Ped. Inf. Dis.**, v. 13, p. 510-5, 1994.

BENARD G.; DURANDY, A.; HONG, M.A.; ASSIS, C.M.; LACAZ, C.S.; SATO, M.N.; MENDES-GIANINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S. T and B cell responses in healthy sensitized and non sensitized donors to a *P. brasiliensis* cell wall extract. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 189-94, 1995.

BENARD G.; MENDES-GIANINI, M.J.S.; JUVENALE, M.; DUARTE, A.J.S. Antigen specific immunosuppression in human paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 7-12, 1996.

BENARD G, MENDES-GIANNINI MJS, JUVENALE M, MIRANDA ET, DUARTE AJS. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**; v.175, p.1263-7, 1997

BENNOUNA J, HILDESHEIM A, CHIKAMATSU K, GOODING W, STORKUS WJ, WHITESIDE TL. Application of IL-5 ELISPOT assays to quantification of antigen-specific T helper responses. **J. Immunol. Methods**. v. 261(1-2), p.145-56, 2002.

BENTLEY-HIBBERT, S. L.; QUAN, X.; NEWMAN, T.; HUYGEN, K.; GODFREY, H. P. Pathophysiology of Antigen 85 in patients with active tuberculosis: Antigen 85 Circulates as Complexes with Fibronectin and Immunoglobulin G. **Infect. and Immun.**, v. 67 (2), p. 581-8, 1999.

BHATTACHARYYA, S.; SINGLA, R.; DEY, A. B.; PRASAD, H. K. Dichotomy of Cytokine Profiles in Patients and High-Risk Healthy Subjects Exposed to Tuberculosis. **Infect. and Immun.**, p. 5597-603, Nov. 1999.

BORYSIEWICZ LK, MORRIS S, PAGE J, et al. Hman cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes: Requirements for in vitro generation and specificity. **Euro. J. Immunol** .; v.13, p. 804-809, 1983.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA. **Tuberculose. Guia de Vigilância Epidemiológica**. 2002.

BREWER, T.F. Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin Vaccine: A meta-analysis of the literature. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31(3), p.64-7, 2000.

CARDOSO, F. L.; ANTAS, P. R.; MILAGRES, A. L.; GELUK, A.; FRANKEN, K. L.; OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, H. C.; NOGUEIRA, S. A.; SARNO, E. N.; KLATSER, P.; OTTENHOFF, T. H.; SAMPAIO, E. P. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 in brazilian tuberculosis patients. **Infect. Immun.**, v. 70 (12), p. 6707-14, 2002.

CLERICI M, HAKIM FT, VENZON DJ, BLATT S, HENDRIX CW, WYNN TA, SHEARER GM. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. **J. Clin. Invest.**, v.91(3), p.759-65,1993.

DOHERTY, T.M.; DEMISSIE, A.; OLOBO, J.; WOLDAY, D.BRITTON, S.; EGUALE, T.; RAVN, P.; ANDERSEN, P. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical Infection among contacts of Tuberculosis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40(2), p. 704-6, 2002.

EWER, K.; DEEKS, J.; ALVAREZ, L.; BRYANT, G.; WALLER, S.; ANDERSEN, P.; MONK, P.; LALVANI, A. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. **Lancet**, v. 361, p. 1168-1173, 2003.

FINE, P.E.; STERNE, J.A.; PONNIGHAUS, J.M.; REES, F.J.- Delayed hypersensitivity mycobacterial vaccines and protective immunity. **Lancet**, v.344, p.1245-124, 1994.

FLANAGAN KL, LEE EA, GRAVENOR MB, REECE WH, URBAN BC, DOHERTY T, BOJANG KA, PINDER M, HILL AV, PLEBANSKI M. Unique T cell effector functions elicited by Plasmodium falciparum epitopes in malaria-exposed Africans tested by three T cell assays. **J. Immunol.**, v.167(8), p.4729-37,2001.

FREIRE, D.N. Tuberculose. In: AMATO NETO, V.; BALDY, J.L.S. **Doenças Transmissíveis**. São Paulo: Ed. Sarvier,. p.845-68, 1989.

GELUK, A.; van MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K. L. M. C.; SUBRONGO, Y. W.; WIELES, B.; AREND, S. M.; SAMPAIO, E. P.; de BOER, T.; FABER, W. R.; NAAFS, B.; OTTENHOFF, T. H. M. Identification and Characterization of the ESAT-6 Homologue of *Mycobacterium leprae* and T-Cell Cross-reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** , v. 70(5), p. 2544-8, 2002.

GODKIN AJ, THOMAS HC, OPENSHAW PJ. Evolution of epitope-specific memory CD4(+) T cells after clearance of hepatitis C virus .**J Immunol.**,v.169(4), p.2210-4, 2002.

GONG JH, ZHANG M, MODLIN RL, LINSLEY PS, IYER D, LIN Y, BARNES PF. Interleukin 10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression, **Infect. Immun.**, v.64, p.913-918,1996.

HICKMAN, S. P.; CHAN, J.; SALGAME, P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naïve T cell polarization. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4636-42, 2002.

HIRSCH CS, TOOSSI Z, OTHIENO C, JOHNSON JL, SCHWANDER SK, ROBERTSON S, WALLIS RS, EDMONDS K, OKWERA A, MUGERWA R, PETERS P, ELLNER JJ. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. **J. Infect. Dis.**,v.180(6), p.2069-73, 1999.

HOROWITZ, H.W.; LUCIANO, B.B.; KADEL, J.R.; WORMSER, G.P. Tuberculin skin test conversion in hospital employees vaccinated with bacille Calmette - Guérin: recent *Mycobacterium tuberculosis* infection or booster effect. **Am. J. Infect. Control.**, v. 23, 181-187, 1995.

HUEBNER, R.E., SCHEIN, M.F., BASS, J.B.JR. The tuberculin skin test. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. 968-75, 1993.

HUYGEN, K.; VAN VOOREN, J. P.; TURNEER, M.; BOSMANS, R.; DIERCKX, P.; DE BRUYN, J. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production and serum immunoglobulin G directed against a purified 32kDa Mycobacterial Protein antigen (P32) in Patients with active Tuberculosis. **Scand. J. Immunol.** , v. 27, p. 187-94, 1988.

JO, E.-K.; KIM, H. -J.; LIM, J. -H.; MIN, D., SONG, Y.; SONG, C. -H.;
PAIK, T. -H.; SUHR, J. -W.; PARK, J. -K. Dysregulated production of
Interferon-(gamma), Interleukin-4 and Interleukin-6 in early tuberculosis
patients in response to antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis*.
Scand. J. Immunol., 51(2), p. 209-17, 2000.

KAUFMANN, S. H. E. How Can Immunology Contribute to the Control of
Tuberculosis? **Nature Reviews**, v. 1(1), p. 20-30, 2001.

KRENSKY, A.M. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T
lymphocytes and natural killer cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59 (4), p.
317-20, 2000.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; de SOUZA, G.R.M. Tuberculose: do
ambulatório à enfermaria. São Paulo, **Atheneu**, p. 1-6, 2000.

LALVANI A, BROOKES R, WILKINSON RJ, MALIN AS, PATHAN AA,
ANDERSEN P, DOCKRELL H, PASVOL G, HILL AV. Human cytolytic
and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for
Mycobacterium tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** , v.95(1),
p.270-5, 1998.

LALVANI, A., PATHAN, A.A., DURKAN, H., WILKINSON, K.A.,
WHELAN, A., DEEKS, J.J., REECE, W.H.H., LATIF, M., PASVOL, G.,

HILL, A.V.S. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. **Lancet**, v. 357 (9273), p.2017-21, 2001.

LANE, P. & GROSS, S. S. Nitric Oxide: promiscuous and duplicitous. **Science & Medicine**, v. 8(2), p. 96-107, 2002.

LEE, E. & HOLZMAN, R.S. Evolution and current use of Tuberculin test. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 365-70, 2001.

LEIN, A. D.; von REYN, C. F.; RAVN, P.; HORSBURGH, JR, C.R.; ALEXANDER, L.N.; ANDERSEN, P. Cellular Immune Responses to ESAT-6 Discriminate between Patients with Pulmonary Disease Due to *Mycobacterium avium* Complex and Those with Pulmonary Disease Due to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.6 (4), 606–609, 1999.

LILLEBAEK, T.; DIRKSEN, A.; BAESS, I.; STRUNGE, B.; THOMSEN, V.Ø.; ANDERSEN, Å.B. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 401-4, 2001.

LJUNGMANN P, LÖNNQVIST B, GAHRTON G, R et al. Cytomegalovirus-Specific Lymphocyte Proliferation and in vitro Cytomegalovirus IgG Synthesis for Diagnosis of Cytomegalovirus Infections After Bone Marrow Transplantation. **Blood.** v.68(1), p.108-112, 1986.

MAECKER, H. T. & MAINO, V.C. T Cell immunity to HIV: defining parameters of protection. **Curr. HIV Research.**, v .1, p.249-59, 2003.

MASUNGI, C.; TEMMERMAN, S.; VAN VOORIN, J.P.; DROWART, ^a; PETHE, K.; MENOZZI, F.D.; LOCTH, C.; MASCART, F. Differential T and B cell responses against *M. tuberculosis* Heparin Binding Hemagglutinin Adhesion in Infected Healthy Individuals and Patients with Tuberculosis. **The J. of Infect. Dis.**, v.185, p.513-520, 2002.

MATHEMA, B.; BIFANI, P. J.; DRISCOLL, J.; STEINLEIN, L.; KUREPINA, N.; MOGHAZEH, S. L.; SHASHKINA, E.; MARRAS, S. A.; CAMPBELL, S.; MANGURA, B.; SHILKRET, K.; CRAWFORD, J. T.; FROTHINGHAM, R.; KREISWIRTH, B. N. Identification and evolution of an IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* cluster. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 641-9, 2002.

McDYER JF, HACKLEY MN, WALSH TE, COOK JL, SEDER RA. Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T cell counts have impaired Th1 responses. **J. Immunol.**, v.158(1), p.492-500, 1997.

MCSHANE H, PATHAN AA, SANDER CR, KEATING SM, GILBERT SC, HUYGEN K, FLETCHER HA, HILL AV. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nat. Med.**, v.10(11), p.1240-4, 2004.

MENDES AV, BENARD G, PEREIRA CB, KALLAS EG, DUARTE AJ, PANNUTI CS, DULLEY FL, MACHADO CM. Different kinetics in anti-cytomegalovirus immunity reconstitution evaluated by lymphocyte proliferation and IFN-gamma production in allogeneic and autologous bone marrow transplantation. **Acta Haematol.**, v.107(4), p.187-94, 2002.

MENOZZI, F.D.; ROUSE, J. H.; ALAVI, M.; LAUDE-SHARP, M.; MULLER, J.; BISCHOFF, R. ; BRENNAN, M. J.; LOCHT, C. Identification of a heparin-binding hemagglutinin Present in Mycobacteria. **J. Exp. Med.** , v. 184, p. 993-1001, 1996.

MENOZZI, F.D.; BISCHOFF, R.; FORT, E.; BRENNAN, M. J.; LOCHT, C. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding haemagglutinin, a mycobacterial adhesin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** , v. 95(21), p. 12625-30, 1998.

MOURA EP, TOLEDO VP, OLIVEIRA MH, SPINDOLA-DE-MIRANDA S, ANDRADE HM, GUIMARAES, TMPD. Pulmonary tuberculosis: evaluation of interferon-gamma levels as an immunological healing marker based on the response to the Bacillus Calmette-Guerin.. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99(3), p. 283-7, 2004.

MUSTAFA AS, AMOUDY HA, WIKER HG, ABAL AT, RAVN P, OFTUNG F, ANDERSEN P Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of Mycobacterium tuberculosis.. **Scand. J. Immunol.**; v.48(5), p.535-43, 1998.

PATHAN, A.A.; WILKINSON, K.A.; WILKINSON, R.J.; LATIF, M.; McSHANE, H.; PASVOL, G.; HILL, A.V.S.; LALVANI, A. High frequencies of circulating IFN- γ - secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted Mycobacterium tuberculosis-infected subjects without disease. **Eur. J. Immunol.**, v. 30(9), p. 2713-21, 2000.

PATHAN AA, WILKINSON KA, KLENERMAN P, MCSHANE H, DAVIDSON RN, PASVOL G, HILL AV, LALVANI A.J Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. **Immunol.** v.167(9), p.5217-25, 2001.

PEREIRA, C.B.; PALACI, M.; LEITE, O. H. M.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlaters with clinical manifestations. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 25-33, 2004.

POLLOCK, J. M. & ANDERSEN, P. The potencial of the ESAT-6 antigen secreted by virulent Mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. **J. Infect. Dis.** , v. 175, p. 1251-4, 1997.

RAVN, P.; DEMISSIE A.; EGUALE, T.; WONDWOSSON, H.; LEIN, D.; AMOUDY, H.; MUSTAFA, A. S.; JENSEN, A. K.; 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.** , v. 179, p. 637-45, 1999.

REECE WH, PINDER M, GOTHARD PK, MILLIGAN P, BOJANG K, DOHERTY T, PLEBANSKI M, AKINWUNMI P, EVERAERE S, WATKINS KR, VOSS G, TORNIEPORTH N, ALLOUECHE A, GREENWOOD BM, KESTER KE, MCADAM KP, COHEN J, HILL AV. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. **Nat. Med.**, v.10(4), p.406-10, 2004.

RODRIGUES, D.S.S.; MEDEIROS, E. A. S.; WELKX, L.Y.; BONNEZ, W.; SALOMÃO, E. % KALAAS, E. G. Immunophenotypic Characterization of Peripheral T Lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. **Clin. Exp. Immunology** , v.128, p. 149-154, 2002.

ROJAS, R. E.; BALAJI, K. N.; SUBRAMANIAN, A.; BOOM, W. H. Regulation of Human CD4+ $\alpha\beta$ T-Cell-Receptor-Positive (TCR+) and $\gamma\delta$ TCR+ T-Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis* by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor β . **Infect. Immun.**, p. 6461-72, 1999.

ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. ; DUARTE, A. J. S.;
BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in
vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioi-
domycosis patients. **Cytokine**, v.18,149-57, 2002.

ROTHMAN, K.J., GREENLAND, S. **Modern Epidemiology**. 2nd Edition.
Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, 1998. Capitulo
Correlation and Regression Models

SANCHEZ FO, RODRIGUEZ JI, AGUDELO G, GARCIA LF. Immune
responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and
healthy controls. **Infect. Immun.**, v.62(12), p.5673-8,1994.

SHAMS, H.; WIZEL, B.; WEIS, S.E.; SAMTEM, B.; BARBNES, P. F.
Contribution of CD8+ T Cells to gamma interferon production in human
tuberculosis. **Infect. Immun.**,:v. 69(5), p. 3497-3501, 2001.

STROHMEIER, G.R. & FENTON, M.J. Roles of lipoarabimannan in
the pathogenesis of tuberculosis. **Microbes and Infection**, p. 709-717,
1999.

SUCCI, R.C.M. **Meningoencefalite Tuberculosa na Infância - Estudo de 358 casos. Aspectos Clínicos, Laboratoriais e Fatores Prognósticos.** 1990. 240 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina. São Paulo.

SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. **Immunology.** v.81(2), p.171-6, 1994.

TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6^a ed. Artmed Editora, p. 311, 2000.

TURNER, J. ; GONZALEZ-JUARRERO, M.; ELLIS, D. L.; BASARABA, R.J.; KIPNIS, A . ; ORME, I. A . & COOPER, A . M. In Vivo IL-10 Reactivates Chronic Pulmonary Tuberculosis in C57BL/6 Mice. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 6343-6351, 2002.

TSUYUGUCHI, I. Immunology of tuberculosis and cytokines. **Kekkaku**, v. 70(5), p. 335-46, 1995.

ULRICH, T.; ANDING, P.; PORCELLI, S.; KAUFMANN, S.H.E.; MUNK, M.E. Increase numbers of ESAT-6 and Purified Protein derivate-specific Gamma interferon-producing cells in subclinical and active Tuberculosis infection. **Infect. and Immun.**, v. 68(10), p. 6073-6, 2000.

UMA H, SELVARAJ P, REETHA AM, XAVIER T, PRABHAKAR R, NARAYANAN PR. Influence of HLA-DR antigens on lymphocyte response to Mycobacterium tuberculosis culture filtrate antigens and mitogens in pulmonary tuberculosis. **Tuber. Lung. Dis.**, v.;79(4), p.199-206,1999.

VASCONCELOS D. M., ORII NM, ROMANO CC, IQUEOKA RY, DUARTE AJ. Characterization of the cellular immune function of patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.123(2), p. 247-53, 2001.

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.**, v.69(10), p.6554-7, 2001.

VON BAEHR, V. , MAYER, W., LIEBENTHAL, C., VON BAEHR, R., BIEGER, W.; VOLK, H.D.. Improving the in vitro antigen specific T cell proliferation assay: the use of interferon-alpha to elicit antigen specific stimulation and decrease bystander proliferation. **J. Immunol. Methods**, v.251(1-2), p.63-71, 2001.

WITTES, R.C. Immunology of Bacille Calmette-Guérin and related topics. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31(3), p. 59-63, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. **WHO Report**, p. 295, 2002.

YAMADA, H.; MATSUMOTO, S.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, T.; YAMASHITA, U. Enhancing effect of na inhibitor of nitric oxide synthesis on bacillus Calmette-Guerin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cer cell line MBT-2 in vitro. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 91(5), p.534-42, 2000.

YOUNG, D.B. Novel Strategies for intervention Targeted at Mycobacterial Persistence. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33(6), p. 403-4, 2001.

ZHANG M, LIN Y, IYER DV, GONG J, ABRAMS JS, BARNES PF. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis.

Infect. Immun., v.63(8), p.3231-4, 1995.