

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**Reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de Imunoglobulina M,
Imunoglobulina G e Imunoglobulina A contra a proteína rHsp-X (Rv 2031c)
de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose pleural**

Loanda Carvalho Sant' Ana Limongi

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Junqueira Kipnis

Goiânia
2009

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

11. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

12. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Loanda Carvalho Sant' Ana Limongi				
CPF:	71713190168	E-mail:	Loanda9@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo Empre-gatício do autor			Bolsista		
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico			Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de Imunoglobulina M, Imunoglobulina G e Imunoglobulina A contra a proteína rHsp-X (Rv 2031c) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em pacientes com tuberculose pleural				
Palavras-chave:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Hsp-X, Imunoglobulina M, Imunoglobulina G, Imunoglobulina A e tuberculose pleural.				
Título em outra língua:	Linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of immunoglobulin M, immunoglobulin G and immunoglobulin A against the protein rHSP-X (Rv 2031c) of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in patients with pleural tuberculosis.				
Palavras-chave em outra língua:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Hsp-X, Immunoglobulin M, Immunoglobulin G, Immunoglobulin A and pleural tuberculosis.				
Área de concentração:	Imunologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	18/12/2009				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador(a):	Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis				
CPF:	37014692100	E-mail:	apkipnis@gmail.com		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ **Assinatura do(a) autor(a)**

Data: ____ / ____ / ____

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

Loanda Carvalho Sant' Ana Limongi

**Reação imunoenzimática (ELISA) para detecção de Imunoglobulina M,
Imunoglobulina G e Imunoglobulina A contra a proteína rHsp-X (Rv 2031c)
de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose pleural**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Tropical do Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública, como
requisito para obtenção do Título de Mestre em
Medicina Tropical.

Área de concentração:
Imunologia

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do CNPq.
Português revisado por Paulliany Ferreira Queiroz.

Goiânia
2009

Dedico esta dissertação aos meus pais, Marlene e José Sant' Ana, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

Ao meu companheiro Roberto, por toda força, entusiasmo, contribuição, amor, paciência e companhia ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, começo e fim de tudo.

À Profª. Drª. Maria do Rosário por ser fonte de inspiração e dedicação, ao trabalho e a família, por me abrir as portas de seu laboratório e por me levar ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e indicar para então minha orientadora, Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis. Muito Obrigada, sem você nada teria acontecido!

À minha orientadora, Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis por ser uma interlocutora disposta a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante todo o meu processo de aprendizado. Por ser paciente e generosa e pela coragem de ousar e trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntas. Muito obrigada, você sempre estará no meu coração!

Ao Prof. Dr. Milton e à Profª. Drª. Fátima Ribeiro Dias pela oportunidade de acompanhar as aulas de imunologia e posteriormente às aulas da pós-

graduação que tanto contribuíram para o meu aprendizado e crescimento.

Obrigada! Admiro muito vocês!

Ao Prof. Dr. André Kipnis por me incentivar na busca do crescimento, sendo exemplo de competência, garra, determinação e disciplina, e principalmente pelas sábias idéias que me auxiliaram nos momentos complicados.

Aos colegas de laboratório pela amizade e disposição em ajudar: Eduardo, Bruna, Mayara, Cinthia, Hidelbrando, Fernando, Arioldo, Michelle, Ediane, Francielly, Rafael, Lorena, Camila e Dr^a. Alessandra Marques. Obrigada vocês fizeram parte de minha história!

À Prof^a. Dr^a. Mariane e à Prof^a. Dr^a. Natália por me inspiraram e por me despertam o interesse pela Imunologia. Vocês são exemplos de mulheres!

À Prof^a. Dr^a. Lee Chan Chan e à Prof^a. Dr^a. Mara pela oportunidade de fazer seus cursos que tanto me acrescentou. Obrigada!

Ao Prof. Dr. João Alves pelo incentivo, colaboração, pelas estratégias boladas que contribuíram para busca constante do paciente. Obrigada!

Ao Marcos Junqueira pelo interesse e disposição em trabalhar comigo.

A todas as pessoas da epidemiologia, em especial à Lúcia e à Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia por contribuírem para a concretização de projetos por nós ousados.

Ao Prof. Dr. Marcus Conde pelo conhecimento, conselhos e explicações tão válidas.

À Liliane Olival pelas amostras de soro e líquido pleural cedidas.

A minha família, que é exemplo de amor, união e luta. Em especialmente meu pai, por me apoiar e acreditar sempre em mim, mesmo nos momentos de desânimo, em especial por me fazer entender a importância dos estudos e por se mostrar interessado e disposto a contribuir. Pela constância de me fazer estudar inglês. Sem você pai, eu não estaria aqui. Te amo! Obrigada!

A minha mãe pela paciência nas horas de estresse e desespero, pelo carinho e pelo afago nos momentos difíceis. Te amo. Obrigada mãe!

Ao meu irmão que tanto alegra minha vida.

Ao meu marido, Roberto, por me apoiar e me amar incondicionalmente. Você é meu maior exemplo. Você faz tudo parecer mais fácil e é definitivamente o que eu tenho de melhor! Te amo!

Agradeço à banca de exame de qualificação, Prof. Dr. João Alves, Prof. Dr. Fátima Dias e Prof. Dr. Irmtraut Araci e à banca de defesa, Prof. Dr. João Alves, Prof. Dr. Marize C. V. Bozinis e Prof. Dr. Ana Paula J. Kipnis, pelo carinho, discricão e profissionalismo dedicados à avaliação de minha dissertação. Pelas valiosas palavras de incentivo e reconhecimento.

*A todos do IPTSP, em especial a Divina, Sr. Fernando, Aparecida, Almir ,
José Clementino e Kariny por me tratar sempre com muito carinho,
agradeço, profundamente, e dedico o resultado desse trabalho.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
pelo apoio financeiro.*

Muito Obrigada!!!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima!”

Louis Pasteur

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estimativa do número de casos novos de TB, por países, em 2007...3
- Figura 2.** Fluxograma dos indivíduos recrutados para o estudo.....33
- Figura 3.** Níveis séricos de IgM anti- rHsp-X do soro e do LP de pacientes com e sem TBP.....42
- Figura 4.** Níveis séricos de IgG anti- rHsp-X do soro e do LP de pacientes com e sem TBP.....44
- Figura 5.** Níveis séricos de IgA anti- rHsp-X do soro e do LP de pacientes com e sem TBP.....46

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Dados sócio-demográficos da população utilizada no estudo.....40

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade dos testes imunoenzimáticos com IgM, IgG e IgA do soro e do LP, obtidos através da curva ROC.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina Deaminase
BAAR	Bacilos Álcool Ácido Resistentes
BCG	Bacilo Calmette Guérin
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CR	Receptor do Complemento
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DO	Densidade Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EI	Escarro induzido
Et	Etionamida
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HspX	Proteína do Choque Térmico - X
IDT	Instituto de Doença do Tórax
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
IFN γ	Interferon Gama
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
LJ	Lowenstein Jensen

LP	Líquido Pleural
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>M. tuberculosis Mycobacterium tuberculosis</i>	
NK	<i>Natural Killer</i>
NTBP	Não Tuberculoso Pleural
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Orto-fenileno-diamina
PAS	Ácido Para-Amino-Salicílico
RJ	Rio de Janeiro
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor
SME	Setor de Métodos Especiais
TB	Tuberculose
TBP	Tuberculose Pleural
TGF- β	Fator Transformador do Crescimento β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UT	Unidades por Litro
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Etiologia.....	3
1.2 Patogenia – TBP.....	4
1.2.1 A pleura, espaço pleural e derrame pleural.....	6
1.3 Principais proteínas do <i>M. tuberculosis</i>	7
1.3.1 Hsp-X.....	8
1.4 Resposta Imune ao <i>M. tuberculosis</i>	9
1.5 Imunidade Humoral.....	14
1.6 Principais citocinas envolvidas na resposta imune à TBP.....	17
1.7 Diagnóstico da TBP.....	19
1.7.1 Teste tuberculínico.....	19
1.7.2 Adenosina deaminase (ADA).....	20
1.7.3 Radiografia de tórax.....	21
1.7.4 Biópsia e exame anatomopatológico.....	21
1.7.5 Padrão Ouro.....	22
1.8 Testes sorológicos usados em pesquisa para diagnóstico de TBP.....	23
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Modelo do estudo.....	32

4.2 População de referência	32
4.3 População em estudo.....	32
4.4 Seleção da amostra.....	33
4.5 Toracocentese e biópsia pleural.....	34
4.6 Indução do escarro e prova tuberculínica.....	34
4.7 Antígeno Recombinante.....	35
4.8 Anticorpos (conjugados).....	35
4.9 Teste imunoenzimático para detecção de IgM, IgG e IgA do soro e do LP.....	36
4.10 Análise estatística.....	37
4.11 Aspectos éticos deste estudo.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Dados clínicos e epidemiológicos da população em estudo.....	39
5.2 Reconhecimento do antígeno recombinante Hsp-X por anticorpos IgM séricos e pleurais dos pacientes TBP pelo ensaio de ELISA.....	41
5.3 Reconhecimento do antígeno recombinante Hsp-X por anticorpos IgG séricos e pleurais dos pacientes com TBP pelo ensaio de ELISA.....	43
5.4 Reconhecimento do antígeno recombinante Hsp-X por anticorpos IgA séricos e pleurais dos pacientes com TBP pelo ensaio de ELISA.....	45
5.5 Determinação da sensibilidade e especificidade dos ELISAS propostos....	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

10. ANEXOS	90
1. Ficha de coleta de dados dos LP e soros armazenados no banco de soros da Universidade de Pesquisa em TB do IDT/ HUCFF da UFRJ.....	90
2. Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	96
3. Questionário CAGE resumido.....	100
4. <i>Performance status</i>	101
5. Critérios CDC Modificado – Doenças indicativas de AIDS.....	102
6. Aprovação da comissão de ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.....	104

RESUMO

A tuberculose pleural (TBP) frequentemente tem resolução espontânea, mesmo sem tratamento. No entanto, a ausência de diagnóstico e tratamento pode levar, nos cinco anos subseqüentes, à ocorrência de tuberculose pulmonar e/ ou extrapulmonar em 65% dos casos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da utilização do antígeno Hsp-X em um ensaio imunoenzimático para determinação da presença de TBP em indivíduos com derrame pleural. Para o estudo foram utilizadas 132 amostras de soro e líquido pleural (LP) de pacientes com derrame pleural. Destas, 97 amostras eram de pacientes TBP e 35 de pacientes com outras doenças não tuberculosas (NTBP) (28 pacientes por câncer metastático, 1 pacientes por insuficiência cardíaca congestiva, 2 paciente por insuficiência hepática, 1 paciente por lúpus eritematoso sistêmico e 3 pacientes por derrames parapneumônicos). Os níveis de IgM do LP foram mais elevados nos pacientes com TBP do que os NTBP, a sensibilidade do ELISA para do LP de 42%, para a especificidade de 83%. Os ensaios para pesquisa de IgG, do soro e do LP, contra o antígeno Hsp-X não foram eficazes em discriminar pacientes com TBP de outras doenças, a sensibilidade encontrada foi de 13% e 16%, utilizando o soro e o LP, respectivamente, para a mesma especificidade de 83%. A densidade óptica dos ensaios para pesquisa de IgA, específicos para o antígeno rHsp-X, foi mais elevada nos pacientes TBP do que os NTBP, o ELISA com a IgA do LP foi melhor que o ELISA do soro, a sensibilidade foi de 65% e 39%, respectivamente, para a mesma especificidade de 83%. Concluimos que o reconhecimento de Hsp-X recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* pelos

anticorpos IgA do LP de pacientes com TBP indicam que esse antígeno poderá ser utilizado para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico complementar para casos de TBP. Estudos adicionais precisam ser realizados para confirmar tal hipótese.

Palavras Chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Hsp-X, Imunoglobulina M, Imunoglobulina G, Imunoglobulina A e tuberculose pleural.

ABSTRACT

Pleural tuberculosis (TBP) has often spontaneous resolution, even without treatment. However, the lack of proper diagnosis and treatment can lead to the occurrence of pulmonary and/or extra-pulmonary tuberculosis in 65% of the cases, in the five years subsequent. **The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the recombinant Hsp-X antigen (rHsp-X) in an enzyme immunoassay for determining the presence of TBP in patients with pleural effusion. For this study we used 132 samples of serum and pleural fluid (PF) from patients with pleural effusion. Of these, 97 samples were from TBP patients and 35 patients with diseases other than tuberculosis (NTBP) (28 patients with metastatic cancer, 1 patient with congestive heart failure, 2 patients with liver failure, 1 patient with systemic lupus erythematosus and 3 patients with parapneumonic effusion). The IgM levels of PF were higher in patients with PTB than NTBP, the sensitivity and specificity of the ELISA for the PF was 42% and 83%, respectively. Testing for IgG from the serum and the PF against the recombinant antigen Hsp-X were not effective in discriminating TB patients from other diseases, the sensitivity was found to be 13% and 16% using serum and LP, respectively, with the same specificity of 83%. TBP patients presented higher levels of IgA specific for the rHSP-X than NTBP, the IgA ELISA using PF presented better sensitivity (65%) than using serum (39%), while the IgA ELISA for both types of samples presented the same specificity (83%). In conclusion, the recognition of *Mycobacterium tuberculosis* rHsp-X by IgA antibodies from the PF of patients with TBP**

reveals its possible role in the development of a diagnostic test for additional cases of TBP. Further studies must be conducted to confirm this hypothesis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Hsp-X, Immunoglobulin M, Immunoglobulin G, Immunoglobulin A and pleural tuberculosis.

I – Introdução

“A Tuberculose gerou vítimas em toda a história da humanidade e matou mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano no mundo.”

Thomas M. Daniel

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica que assola a humanidade desde a antiguidade (Tarantino 2002). É uma doença milenar, talvez a mais antiga, conhecida pelos humanos, com relatos de lesões encontradas em ossos humanos pré-históricos localizados na Alemanha e em múmias no Egito, datados de 7000-3000 a.C. (Conde et al. 2000).

Atualmente, um terço da população mundial está infectada com *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), o que representa aproximadamente 9,3 milhões de novos casos e aproximadamente 3 milhões de mortes por ano (WHO 2009).

A Índia, a China, a Indonésia, a Nigéria e a África do Sul estão no topo da classificação quanto às regiões com o maior índice de casos por TB. A Ásia (Sudeste Asiático e região do Pacífico Ocidental) detém 55% dos casos globais, a região Africana, 31% e as outras três regiões (Américas, Europa e Mediterrânea Oriental) detêm uma fração menor dos números de casos (Figura 1) (WHO 2009).

Na classificação dos quinze países com maior incidência, estimada pela OMS (2009), treze pertencem à África, fenômeno ligado às altas taxas de co-infecção por HIV.

O Brasil é um país em desenvolvimento que faz parte do grupo de vinte e dois países que possui 80% dos casos de TB (www.who.int/tb/countryprofile) e é também o **detentor do maior número de casos da América Latina** (Natal et al. 2003; Rossette et al. **2006**). **Os números são alarmantes, estima-se que mais de 50 milhões de pessoas estão infectadas, com aproximadamente 92 mil novos casos por ano. Em 2007, o número de mortes pela doença, em nosso meio, foi de mais ou menos 8,4 mil e a taxa de incidência cerca de 50 casos por 100.000 habitantes (WHO 2009). As regiões Norte, Nordeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência, 47,55, 48,67 e 45,25, respectivamente, enquanto que as regiões Sul e Centro-Oeste apresentaram as menores taxas, com 32,62 e 25,82, respectivamente (Ministério da Saúde 2005). Em 2006, 14 820 casos de TB foram notificados no Estado do Rio de Janeiro, conforme dados publicados pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). No mesmo ano, conforme o boletim da Secretaria de Saúde do município do Rio de Janeiro, 7 073 casos de TB também foram notificados, somente na capital.**

Segundo a FUNASA, a TB se manifesta no Brasil em formas pulmonares (85,6%) e extrapulmonares (14,4%). Entre os casos de TB extrapulmonares, a doença pleural é a mais frequente (45,8% das formas extrapulmonares), seguidas pela ganglionar (21,5%) (BOLETIM 2004; WHO 2009). A tuberculose pleural (TBP) é uma manifestação comum da doença extrapulmonar e é particularmente importante nas regiões com uma prevalência elevada de TB. A incidência de TBP depende da região estudada e pode alcançar até 38% (WHO 2008).

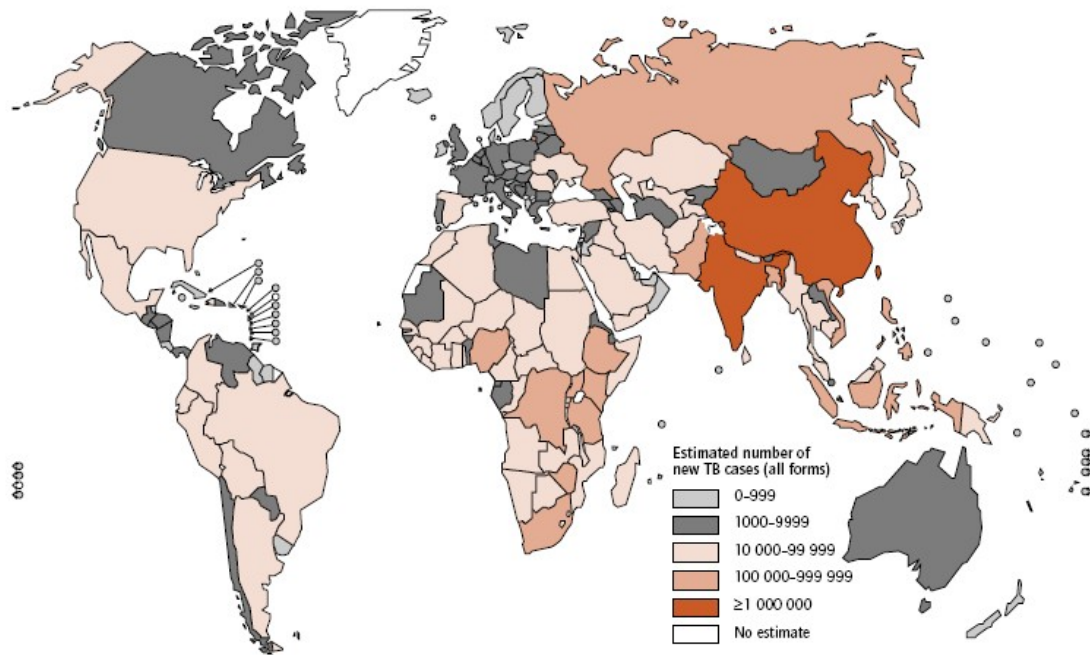


Figura 1. Estimativa do número de casos novos de TB, por países, em 2007.

Fonte: OMS 2007.

1.1 Etiologia

Os bacilos que causam a TB estão agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por *M. tuberculosis*, *M. bovis* subespécie bovis, *M. africanum* e *M. microti*, além da cepa vacinal *M. bovis* BCG. Tem sido proposta a inclusão de novas espécies nesse complexo, como *M. canetti*, uma variedade de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália (Van Soolingen et al. 1997), *M. caprae*, agente etiológico de TB em caprinos (Aranaz et al. 1999), *M. pinnipedii*, que causa TB em leões marinhos, mas que também pode infectar o homem (Cousins et al. 2003). Adicionalmente, *M. bovis*, agente etiológico da TB bovina, também pode infectar o homem e outros animais (Haas & Prez, 1995). Estudos na Argentina e Inglaterra reportaram que

essa espécie é responsável por 0,4% a 1% dos casos da TB humana (Barrera & Kanto 1987; Yates & Grange 1988).

Micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. A família *Mycobacteriaceae* compreende cerca de 100 espécies diferentes, a maioria saprófitas de vida livre (Aranaz et al. 2003).

M. tuberculosis é um bacilo delgado, ácido resistente, de forma ligeiramente curvada, com um comprimento que oscila entre um a quatro micras por 0,2 a 0,6 micrômetros de diâmetro. Ao microscópico, os conglomerados bacilares adquirem uma forma característica, descrita como “contas de rosário” (Rivas et al. 2005). A propriedade estrutural das paredes bacterianas o torna pouco vulnerável à ação dos agentes antimicrobianos de uso diário e aos mecanismos de defesa naturais do hospedeiro (Rivas et al. 2005).

A constituição da parede celular da bactéria é uma das mais completas entre os microorganismos conhecidos. É duas vezes mais espessa e mais forte do que as dos germes Gram negativos e constitui uma verdadeira barreira lipídica, dificilmente penetrável, que outorga à micobactéria sua típica resistência à ação do álcool e dos ácidos (Rivas et al. 2005).

1.2 Patogenia- TBP

A TB é uma doença infecciosa crônica que, na ausência de tratamento eficaz, evolui para a doença ativa, de forma consuptiva, sobrevivendo, como última consequência, a morte (Campos et al. 2000).

Quando a TB ativa se desenvolve, a localização, a severidade e a recuperação da doença são altamente variáveis. A TB miliar, caracterizada pela disseminação hematogênica de um grande número de micobactérias por todo o corpo, é a manifestação mais severa da doença. Em contra partida, a TBP é usualmente auto-limitante. A TB pode se desenvolver em qualquer local do corpo, mas usualmente apresenta-se como infecção pulmonar variando de um infiltrado leve para um estado crônico, cavitária até uma doença destrutiva severa (Crevel et al. 2002).

A infecção por *Mycobacterium* pode ocorrer por ingestão, inoculação na pele e abrasões, mas a maioria das infecções é devida à inalação de gotículas contaminadas, que são eliminadas através da tosse, espirro ou fala, permanecendo no ar por longo período, para então alcançar as vias aéreas (Johnston & Wildrick 1974) e acometer principalmente o pulmão (Hans 2001).

A TBP pode ocorrer pela penetração direta do bacilo dentro do espaço pleural via ruptura da lesão caseosa subpleural primária ou ser secundária a disseminação linfo-hematogênica do bacilo (Lopes et al. 2006). A TBP constitui uma das principais causas de derrame pleural unilateral no Brasil, geralmente surgindo num período de três a sete semanas após a infecção primária, porém podendo ocorrer a qualquer tempo no curso natural da doença (Sahn 1988).

As principais manifestações clínicas são febre, dor torácica do tipo pleurítica e tosse não produtiva. A ausência de febre não exclui o diagnóstico. Sudorese noturna, calafrios, fraqueza e perda de peso estão presentes em 70% dos pacientes (Seiscento et al. 2006).

Na maioria das vezes, o derrame é unilateral, localizado no hemitórax direito e em geral de volume pequeno a moderado. A dispnéia ocorre nos

casos em que o derrame pleural é mais volumoso e de instalação rápida (Conde & Kritski 1995). Em um terço dos pacientes com derrame pleural secundário à TB, é possível identificar lesão parenquimatosa coexistente na radiografia de tórax. Nesses pacientes, o derrame é quase sempre do lado do infiltrado parenquimatoso e indica doença pulmonar ativa (Light, 2006). A TBP frequentemente tem resolução espontânea, mesmo sem tratamento. No entanto, a ausência de diagnóstico e tratamento pode levar, nos cinco anos subsequentes, à ocorrência de TB pulmonar e/ ou extrapulmonar em 65% dos casos (Seiscento et al. 2006).

1.2.1 A pleura, espaço pleural e derrame pleural

O LP, em pequena quantidade, está compreendido no espaço virtual que existe entre os folhetos viscerais e parietais, o qual é chamado de espaço pleural. Essa fina camada de líquido atua como um lubrificante, facilitando deslizamento entre os folhetos pleurais durante a expansão e retração pulmonar, auxiliando na dinâmica respiratória (Murray & Nabel 1994; Miserocchi 1997). A pressão na cavidade pleural é negativa, ou seja, abaixo da pressão atmosférica, e isso se deve, entre outros fatores, às várias forças que atuam sobre o pulmão (Tarantino 2002). O fluxo nos vasos linfáticos pleurais pode aumentar em resposta ao aumento do LP, atuando como um mecanismo de retroalimentação negativa para controlar o volume de LP. Quando a quantidade de LP excede o fluxo linfático máximo, ocorre o derrame pleural (Miserocchi 1997).

1.3 Principais proteínas do *M. tuberculosis*

Cerca de 150 proteínas caracterizadas de *M. tuberculosis* apresentam propriedades antigênicas (Koneman 1992). As mais predominantes foram isoladas, caracterizadas e copiadas por síntese química e seus genes foram enxertados em hospedeiros como a *Escherichia coli*, para a produção em grande escala de proteínas recombinantes (Rose 1997). Para facilitar os estudos, essas proteínas têm sido agrupadas em quatro grupos de acordo com a função, sequência e características físico-químicas.

O primeiro grupo é formado por proteínas do choque térmico (Hsp, do inglês *heat shock protein*), que são polipeptídios essencialmente citoplasmáticos. A expressão dessas proteínas aumenta frente a estímulos estressantes como as mudanças de temperatura, aumento do dano oxidativo e a diminuição de nutrientes. Acredita-se que esse aumento proteja a micobactéria durante situações adversas, pois auxilia na manutenção da conformação funcional das proteínas essenciais e na redução da desnaturação proteica. Agrupam-se em famílias dependendo da massa molecular hsp65 KDa o GroEL, hsp 10 KDa o GroES, hsp 70 KDa o Dnak, hsp 90 KDa, hsp 16 KDa , o Hsp-X ou alfa cristalina, entre outras (Chang et al. 1994). Essas proteínas estão presentes tanto em células procarióticas como eucarióticas e sabe-se que são altamente conservadas dentro e entre as espécies (Chang et al. 1994).

O segundo grupo são as lipoproteínas, incluindo as de 19 KDa, 26 KDa, 27 KDa e 38 KDa, que são constituintes principalmente da parede celular e que podem ser encontradas no citoplasma, sendo as de 19 e 38 KDa as mais importantes. Considera-se que essas lipoproteínas estejam envolvidas na

indução das respostas imunes humoral e celular, especialmente na resposta de células T de memória *in vitro*, e possuam um papel funcional no transporte de nutrientes através da parede celular (Rees et al. 1993).

Um terceiro grupo são as proteínas secretórias, constituído principalmente por proteínas de 15, 18, 23, 26, 27, 30, 31, 31.5 e 41 KDa, algumas destas formam o complexo antígeno 85 que é um dos maiores constituintes do sobrenadante de cultivo de *M. tuberculosis* (Wilker & Harboe 1992; Rojas & Cabrera 2000).

O quarto grupo é formado pelas enzimas L-alanina desidrogenase de 40 KDa e a superóxido desmutase de 23 KDa, que estão envolvidas no mecanismo de defesa do bacilo dentro do macrófago (Wilker & Harboe 1992; Rojas & Cabrera 2000).

1.3.1 Hsp-X

O antígeno Hsp-X (Rv 2031c), do inglês *Heat Shock Protein X*, é uma proteína frequentemente conhecida como antígeno do choque térmico, α -cristalina, proteína de 16/14 KDa e/ ou proteína ARC, por ser codificada na região gênica *arc* (Verbon et al. 1992; Steingart et al. 2009).

Em 1998, foi publicado por Yan e seus colaboradores que a transcrição de *arc* é induzida sob médias condições de hipóxia, em modelos experimentais, usando macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. Essa proteína é requerida para o crescimento *in vivo* da bactéria no interior dos macrófagos murinos derivados da medula óssea e de células monócitos humanos THP-1.

Culturas de *M. tuberculosis* em ambientes com baixa concentração de nutrientes (Betts et al. 2002) ou hipóxia (Sherman et al. 2001; Rosenkrands et al. 2002), ou em pH baixo (Fisher et al. 2002), ou em baixas concentrações de óxido nítrico (Voskuil et al. 2003) fazem a transcrição de 48 genes dormentes regulados por DosR (Rv 3133c). Esses ambientes, provavelmente, mimetizam as condições *in vivo* do tubérculo, na qual o bacilo persiste dormente. Desses genes, o membro mais conhecido regulado por DosR é a proteína de 16 KDa alfa cristalina (Hsp-X) (Yuan et al. 1998).

A proteína Hsp-X é altamente imunogênica para células B, refletida pela presença de anticorpos específicos em aproximadamente 70% dos pacientes com TB pulmonar com escarro positivo para *M. tuberculosis* e 50% dos pacientes com culturas negativas (Jackett et al. 1988; Lee et al. 1992; Raja et al., 2002; Demissie et al. 2006). No que diz respeito às células T, Caccamo e seus colaboradores (2002) reportaram a existência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ que reconhecem epítomos do Hsp-X em pacientes com TB.

1.4 Resposta imune ao *M. tuberculosis*

Os primeiros componentes de defesa do hospedeiro, após a violação das barreiras anatômicas, constituem a imunidade inata, a qual inclui fagócitos mononucleares, células Natural Killer (NK) e outras células de origem linfóide, neutrófilos e fatores presentes no soro, incluindo o sistema complemento e os anticorpos (Crevel et al. 2002).

Os macrófagos alveolares residentes são as primeiras células envolvidas na captura inicial do *M. tuberculosis*. Após esse primeiro encontro,

células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos também fazem parte do processo fagocítico (Crevel et al. 2002).

Antes da fagocitose, o reconhecimento do *M. tuberculosis* ou produtos micobacterianos é o passo principal para uma resposta imune efetiva. O reconhecimento imune do principal componente da parede micobacteriana, a lipoarabinomanana (LAM), assemelha-se muito ao reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram negativas. Vários fatores circulantes e receptores estão envolvidos nesse processo, dentre eles o CD14, os receptores Fc (FcR), os receptores do sistema complemento (CR), presentes na superfície dos macrófagos (Fenton et al. 1998).

Os neutrófilos são as primeiras células responsivas às proteínas micobacterianas, presentes no espaço pleural. Em modelo animal, após inoculação do derivado proteico purificado (PPD) e consequentemente derrame pleural, observa-se que inicialmente predominam neutrófilos os quais são responsáveis pelo recrutamento de monócitos do sangue (Antony et al. 1985). Antony e seus colaboradores (1995) sugerem que as células mesoteliais desempenham um papel importante no recrutamento de neutrófilos e monócitos sanguíneos na TBP. Após alguns dias, os linfócitos são as células dominantes do LP (Wisdraw & Nilsson 1982). A maioria dos linfócitos do LP são linfócitos T, principalmente CD4⁺ (Rossi et al. 1987), com uma média de relação CD4: CD8, de 4,3 no LP e de 1,6 no sangue periférico (Fontes et al. 1990).

Após a fagocitose, células dendríticas e macrófagos apresentam antígenos micobacterianos às células T, os quais se tornam ativados, produzem citocinas que promovem a ativação, diferenciação de macrófagos e

formação do granuloma. Alguns componentes da parede bacteriana, tais como proteínas, complexo proteoglicanas e LAM, são capazes de estimular os macrófagos no local da infecção a produzirem o fator de necrose tumoral (TNF), um importante componente para formação do granuloma (Barner et al., 1990), assim como a interleucina (IL) - 1 (Kuraswa & Shimokata 1991; Ferrer 1997).

A TBP desenvolve principalmente uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela presença de células T CD4⁺ produtoras de interferon gama (IFN γ) (Prabha et al. 2007). O desenvolvimento da resposta imune adaptativa depende, em grande parte, do contexto inicial da ativação, que inclui a duração e a avidéz do contato com o complexo peptídeo/ molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e a presença de moléculas co-estimuladoras (Mucida et al. 2008) e a via de ativação da resposta imune inata. Dependendo da via, *M. tuberculosis* é reconhecida pelas células dendríticas (DCs), diferentes populações celulares podem ser geradas.

Se o reconhecimento de *M. tuberculosis* se der pela via *Toll like Receptor* (TLR) 2, levará as DCs a secretarem IL-23 (Cooper & Khader 2008), polarizando para a resposta imune celular do tipo Th1, eficiente nas infecções causadas pela produção de citocinas como IFN γ , IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- α (Flynn & Chan 2001; Schluger 2001; Orme 2004). Pode ocorrer também uma resposta do tipo Th17, caracterizada pela secreção de IL-17 (Cooper & Khader 2008), importante citocina quimioatraente de neutrófilo (Cruz et al. 2006). Adicionalmente, trabalhos recentes sugerem que a IL-23 desempenha um papel protetor durante a infecção por *M. tuberculosis* por induzir uma resposta

mediada por células Th17 e facilitar a geração de células de memória (Fletcher 2007).

Se o reconhecimento de *M. tuberculosis* for via TLR-4, estimulará principalmente a secreção de IL-10 que ativará uma população de linfócitos T reguladores e uma resposta imune humoral (Th2), não protetora para a TB, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-6, IL-13 e fator transformador do crescimento beta (TGF- β). Porém essa resposta colabora atenuando as lesões inflamatórias provocadas pela infecção (Cooper & Khader 2008).

A resposta imune na TBP é caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de um ambiente Th1. Nessa enfermidade, a expressão de TLR 2 nos monócitos pleurais (Prabha et al. 2008), assim como, os níveis de IFN γ , TNF e IL-12 estão geralmente elevados no LP nessa enfermidade (Maeda et al. 1993; Zhang et al. 1994). A importância de citocinas Th1 está principalmente na contenção da infecção por *M. tuberculosis* (Wallis & Ellner 1994). No decorrer da TBP, observa-se que os níveis de IFN γ e TNF diminuem, ou seja, existe uma modulação negativa em relação ao avanço da doença. Portanto baixas concentrações dessas citocinas podem indicar incapacidade de eliminação do bacilo (Barbosa et al. 2006).

As concentrações de IFN γ e TNF estão diretamente correlacionadas com o aumento do tecido necrosado. Nesse mesmo contexto, uma resposta reguladora se torna satisfatória já que a produção de IL-10 por células T CD4⁺ reguladora contribui para mecanismos que inibem o dano provocado por uma resposta inflamatória crônica, ou seja, a necrose pleural (Barbosa et al., 2006). Adicionalmente, células reguladoras expressando altos níveis de *forkhead box*

P3 (Foxp3), estão abundantes no LP e contribuem para diminuir a proliferação excessiva de células T CD4⁺ CD25⁻ e nesse sentido favorecem o balanço entre a imunidade e a tolerância (Xué- Jun et al. 2008).

O controle efetivo da infecção micobacteriana envolve a contenção do bacilo e a morte de macrófagos infectados, através da ativação destes e recrutamento de linfócitos para o sítio da infecção, com formação de uma estrutura organizada, conhecida como granuloma (Florido et al. 2002). A formação do granuloma é considerada por muitos autores, o componente essencial da resposta imune protetora contra *M. tuberculosis*.

A formação do granuloma está intimamente ligada com a reação de hipersensibilidade do tipo tardia, a qual é desenvolvida por uma resposta imune adaptativa, mediada por células, principalmente linfócitos T e suas citocinas. Macrófagos epitelioides estão presentes no centro do granuloma com algumas células gigantes multinucleadas e essa área central é circundada por linfócitos. Células dendríticas também podem estar presentes. Bezuidenhout e seus colaboradores, em 2009, observaram a presença de células positivas para TNF- α em granulomas necróticos de pacientes com TBP. Apesar disso, a presença de TNF- α na resposta imune contra *M. tuberculosis* é necessária para a formação do granuloma (Bekker et al. 2000; Roach et al. 2002). No centro do granuloma, existe necrose que provavelmente ocorre secundariamente à apoptose de macrófagos infectados, de células epitelioides e de células T ativadas (Keane et al., 1997; Fayyazi et al. 2000). A resolução da lesão granulomatosa é acompanhada por uma cicatrização com participação de fibroblastos na periferia deste. A presença de necrose e fibrose

extensas em granulomas na TBP está associada à progressão da doença (Barbosa et al. 2006).

1.5 Imunidade Humoral

É aceito que a imunidade mediada por células possua um papel crucial no controle da infecção por *M. tuberculosis*, no entanto, evidências convincentes do papel protetor das células B e dos anticorpos contra inúmeros patógenos intracelulares têm sido fundamentadas (Abebe & Bjune 2009; Maglione & Chan 2009).

Uma das principais razões para a noção de que os anticorpos não possuam efeito protetor contra patógenos intracelulares é o fato de eles não poderem entrar no citoplasma das células infectadas e afetar o patógeno. Contudo patógenos intracelulares facultativos tais como *M. tuberculosis* têm fases do ciclo tanto intracelular quanto extracelular. Muitos bacilos intracelulares podem evitar a morte e continuar a multiplicar-se, levando finalmente à lise da célula hospedeira. Os bacilos saem dessas células, passam para o ambiente extracelular até serem capturados por outros macrófagos e monócitos. Essas últimas células ingerem bacilos facilmente, mas são incapazes de matar *M. tuberculosis* virulentos ou inibir seu crescimento. Assim, o ciclo de multiplicação bacilar se repete (Abebe & Bjune 2009).

Estudos *in vitro* também mostraram claramente o papel dos anticorpos na inibição da multiplicação dos patógenos, neutralização de toxinas produzidas por eles, citotoxicidade celular, opsonização, indução da cascata do

complemento e prevenção de infecções em culturas de tecidos (Igietseme et al. 2003; Relijic et al. 2006). Dentre estes, a opsonização é considerada o mecanismo mais importante dos anticorpos na defesa contra *M. tuberculosis* (Abebe & Bjune 2009).

Estudos em camundongos mostram que células B modulam a resposta do hospedeiro frente ao patógeno de várias maneiras. Durante uma infecção aguda, a ligação seletiva aos receptores Fc γ por anticorpos acentua uma resposta Th1 e promove a diminuição e a contenção micobacteriana com inflamação mínima. Inversamente, a ligação a receptores inibitórios Fc γ RIIB aumenta a produção de IL-10 e compromete dessa forma a imunidade contra *M. tuberculosis* (Maglione & Chan 2009).

Adicionalmente, observa-se que durante infecções agudas, células B são requeridas para uma ótima resposta granulomatosa e uma imunidade efetiva contra o bacilo, sendo que a ausência de células B resulta na desorganização do granuloma. Em função disso, um aumento da inflamação é necessário para conter a infecção. Por conseguinte, durante a fase crônica, em que o bacilo é contido, células B igualmente promovem a perpetuação da resposta imune local contra *M. tuberculosis* e contribuem na prevenção da reativação da doença (Maglione & Chan 2009). O que justifica em grande parte a presença de células T e B associadas a nódulos pulmonares durante a infecção, tanto em camundongos quanto em seres humanos (Tsai et al. 2006).

Existem diferentes populações de linfócitos B maduros com capacidade para produzir anticorpos: 1) linfócitos B convencionais também conhecidos como linfócitos B foliculares, linfócitos B2, linfócitos B0, 2) linfócitos B da zona marginal esplênica e 3) linfócitos B1 (Merino & Gruppi 2006).

Durante o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, anticorpos, de alta afinidade, específicos para o patógeno e imunógeno são produzidos pela interação de células B e células T auxiliares. Essa resposta precisa, no entanto, lenta, denominada Timo-dependente, envolve geralmente células B2. Contudo anticorpos presentes no soro, denominados anticorpos naturais, que contribuem para a primeira linha de defesa contra os agentes infecciosos, são produzidos, de maneira Timo-independente, por linfócitos B1 e linfócitos da zona marginal (Merino & Gruppi 2006).

As células B1, responsáveis pela produção de IgM sérica e cavitárias, constituem uma população de linfócitos B com localização anatômica e características fenotípicas e funcionais particulares. Os linfócitos B1 se localizam majoritariamente nas cavidades peritoneal e pleural (Kroese et al. 1992) e apresentam o fenótipo $B220^{low}IgM^{hi}CD23^{low/-}CD43^{+}IgD^{low}$. Essas células possuem características de células ativadas e são de maior tamanho e complexidade citoplasmática que as células B2 (Merino & Gruppi 2006).

Fenotipicamente, os linfócitos B1 presentes na cavidade peritoneal e pleural não são muito diferentes dos linfócitos B1 esplênicos, portanto uma expressão diferencial de moléculas de superfície não explica o porquê dessa população de linfócitos se localizar preferencialmente nesses locais (Merino & Gruppi 2006). Acredita-se que a IL-10, citocina secretada pelos próprios linfócitos B1 peritoneais, participa da retenção destes na cavidade peritoneal. Já foi demonstrado que tanto a quimiocina CXCL-12 quanto a IL-10 contribuem de maneira sinérgica na manutenção dessas células no peritônio (Ishida et al. 1994; Nisitani et al. 1995; Foussat et al. 2001). Propõe-se que a IL-10 aja sobre linfócitos B1, potencializando os efeitos da CXCL-12, produzida pelas células

mesoteliais presentes na cavidade peritoneal. Essa quimiocina tem como principal função manter a sobrevivência dos linfócitos B1, conservá-los na cavidade peritoneal e favorecer a sua proliferação (Balabanian et al. 2002).

Os anticorpos produzidos por linfócitos B1 têm um papel protetor, que está implicado na remoção de células envelhecidas e apoptóticas, em mecanismos de imunomodulação e às infecções, tais como a infecção por *M. tuberculosis* (Merino & Gruppi 2006).

1.6 Principais citocinas envolvidas na resposta imune à TBP

A TBP é um dos melhores modelos para se avaliar a resposta imune celular ao *M. tuberculosis*, pois, no espaço pleural, a doença é auto-limitante, o que quer dizer que ela é muitas vezes curável, sem necessidade de tratamento. Nesse sentido, as citocinas possuem um papel fundamental e por isso devem ser estudadas, pois são importantes peças da resposta imunológica que estão envolvidas na regulação, inflamação e hematopoese.

Quando se comparam as citocinas entre grupos de pacientes com TBP, controles saudáveis e entre a segunda forma mais comum de derrame pleural, pacientes com câncer pleural, nota-se que há um predomínio das citocinas: IFN γ , IL-12p40, IL-18 e IL-8 em pacientes com TBP. Assim como há um predomínio dos níveis de ligante solúvel de sFas (sFasL), provavelmente correlacionado com os níveis de IFN γ e IL-18. Desse modo, a resposta tipo Th1, nessas circunstâncias, é mais pronunciada. Acredita-se que o aumento de Fas e consequente aumento da apoptose possam colaborar de uma forma protetora no final da resposta imune ao *M. tuberculosis*. O fato de o IFN γ e o

FasL estarem aumentados na TBP indica que estes podem ser usados no diagnóstico dessa patologia (Budak et al. 2008). Estudos anteriores concordam em grande parte com esse achado. No LP de pacientes com TBP, há um predomínio das citocinas: IFN γ (Villegas et al. 2000), TNF- α (Ogawa et al. 1997; Hua et al. 1999), IL-12 (Zhang et al. 1994), IL-18 (Vankayalapati et al. 2000) e IL-8 (Yamanda et al. 2001; Dlugovitzky et al. 1997) comparado com LP de outras doenças que causam derrame pleural.

Em pesquisa recente, publicado por Siawaya e seus colaboradores (2009) foram investigados os níveis de 29 citocinas do soro de pacientes HIV negativos, com TB pulmonar sem derrame pleural e em pacientes com TBP com e sem coinfeção por HIV. O grupo controle usado foi de indivíduos saudáveis *M. tuberculosis* latentes e pacientes sem derrame pleural por TB. Observou-se que pacientes com TBP possuem um aumento dos níveis dos marcadores característicos de inflamação, em comparação com pacientes com TB pulmonar, tais como fator de crescimento endodermal, **fator** estimulador de colônias granulocitárias, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, proteína quimioatraente de monócito -1, proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 α), MIP-1 β , TNF- α e **fator** de crescimento vascular endotelial. No entanto, em pacientes com TB pulmonar, sem derrame pleural, notaram-se altos níveis de moléculas envolvidas na interação celular, tais como os de IL12p40 e sCD40L. Siawaya e seus colaboradores ressaltaram que os altos níveis de fatores pró-inflamatórios encontrados no soro de pacientes com TBP, tais como CXCL10/IP-10 e CCL3/ MIP-1 α , podem ser usados como importantes marcadores diferenciais para distinguir a TB pulmonar da TBP.

São desconhecidos os motivos que determinam a cura natural da TBP, tanto o que leva à regressão do derrame pleural quanto o que leva ao desenvolvimento de espessamento pleural, por fibrose. Acredita-se que o TGF- β , sendo uma potente citocina profibrótica, tenha um papel fundamental nesse quadro (Cugell & Kamp 2004). Os níveis de TGF- β são mais elevados no soro e no LP de pacientes com TBP do que em pacientes com transudatos (Ceyhan et al. 2003), o que confirma essa hipótese. Esses altos níveis de TGF- β em pacientes com TBP estão diretamente associados ao aumento do espessamento pleural (Seiscento et al. 2007). Adicionalmente, confirmando tais suposições, observa-se que a administração intrapleural de anticorpos anti-TGF- β reduz a fibrose e, conseqüentemente, o espessamento pleural em pacientes com TBP (Sasse et al. 2003).

1.7 Diagnóstico da TBP

O diagnóstico da TBP permanece um desafio na prática clínica. Os métodos convencionais, bastante úteis para o diagnóstico de TB pulmonar, têm baixa eficácia quando realizados no LP (Kaisemann et al. 2004).

1.7.1 Teste tuberculínico

Na população com alta incidência de TB, em países em que a vacinação com BCG é rotineira, a presença de reação positiva no teste tuberculínico tem valor discutível como método auxiliar no diagnóstico da TBP, se realizada nos

primeiros 10 anos após a vacinação. Em pacientes imunossuprimidos ou anérgicos, o teste negativo não afasta o diagnóstico de doença (Ferrer 1996).

Na fase inicial ou aguda da TBP o teste cutâneo pode ser negativo. Nessa fase, existe normalmente uma linfopenia periférica transitória, pois os linfócitos T CD4⁺ se encontram recrutados no espaço pleural. Após aproximadamente dois meses, pode haver a viragem do teste tuberculínico. A evidência dessa viragem, caracterizada pelo aumento em 10 mm de induração entre o primeiro e o segundo testes, indica a ocorrência de contato recente com o bacilo *M. tuberculosis* (Ferrer 1996).

1.7.2 Adenosina deaminase (ADA)

ADA é uma denominação genérica dada a um grupo de enzimas com massas moleculares distintas, que possuem uma função química semelhante no metabolismo das purinas, catalizando a conversão de adenosina e desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente (Ferrer 1997; Lee et al. 2001).

A ADA está presente em quase todos os vertebrados, no homem, é encontrada principalmente nos linfócitos e está diretamente relacionada à ativação dessas células. Conseqüentemente, em enfermidades em que há maior participação de linfócitos, a ADA geralmente é detectável em níveis elevados (Kaisemann et al. 2004).

Em outras doenças, contudo, que produzem derrame pleural com predomínio de linfócitos, a dosagem de ADA pode apresentar resultados falsos positivos como, por exemplo, em alguns tipos de linfoma, na artrite reumatoide,

no lúpus eritromatoso sistêmico, em alguns adenocarcinomas e no empiema (Wong 2005).

Embora seja um método muito sensível para o diagnóstico da TBP, ainda não foi estabelecido um valor de corte universal que possa ser adotado como referência para a quantidade de ADA no LP, pois há uma faixa ampla de variação dos resultados de país para país, e mesmo em serviços diferentes de uma mesma região (Krenke et al. 2008). Outra dificuldade está relacionada à padronização do método. Apesar de o sistema colorimétrico descrito por Giusti (Giusti 1974) estar disponível há pelo menos duas décadas, de haver descrição de outros métodos de detecção da ADA no LP, e embora seja recomendado pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia dosar ADA no LP, não há um kit industrializado confiável (Kritski et al. 2000).

1.7.3 Radiografia de tórax

A radiografia de tórax é o método de imagem de escolha na avaliação inicial e no acompanhamento de pacientes com TBP. O comprometimento da pleura pode se manifestar através de derrame, espessamento ou calcificação pleural. O derrame pleural geralmente é unilateral, com volume que varia de pequeno a moderado. A presença de imagens parenquimatosas sugestivas de atividade de TB, associadas ao derrame pleural, contribui para o diagnóstico. Essas imagens incluem cavidades de parede espessas, nodulações ou consolidações (Bombarda et al. 2001).

1.7.4 Biópsia e exame anatomopatológico

A obtenção de fragmentos de tecido pleural através de biópsia por agulha foi um grande avanço na investigação diagnóstica das doenças pleurais, pois limitou a abordagem cirúrgica aos pacientes sem diagnóstico. As duas condições principais que podem ser diagnosticadas através desse método são a TB e a neoplasia, metastática ou primária, de pleura (Neves 1992; Light 1995).

A associação da biópsia e cultura do fragmento permite diagnosticar até 87% dos casos. O diagnóstico etiológico de certeza requer a demonstração por cultura de *M. tuberculosis* no LP ou no fragmento de pleura. Embora outras condições como sarcoidose, presença de fungos e artrite reumatoide também sejam granulomatosas, a demonstração de granuloma com ou sem necrose de caseificação é normalmente considerada compatível com TB, por ser esta a responsável por mais de 95% dos casos de granuloma pleural. Em pacientes com sorologia positiva para o HIV e/ou diabéticos graves, pode não haver formação desses granulomas, o que dificulta o diagnóstico pela análise anatomopatológica (Capellozi 2000).

1.7.5 Padrão ouro

O padrão ouro para o diagnóstico da TBP é a cultura com identificação da espécie. Entretanto o resultado, além de demorado, tem uma sensibilidade apenas razoável (Martins et al. 1977; Seibert et al. 1991; Light et al. 1995). A positividade da cultura em meio de Lowenstein-Jensen (LJ) varia de 10% a 35% para o LP e de 39 a 65%, para o fragmento pleural obtido através de

biópsia por agulha (Valdes et al. 1998). Em razão disso, a presença do granuloma com necrose caseosa é aceita como critério de diagnóstico de certeza e a presença do granuloma inespecífico, ou seja, sem o padrão de necrose, vem sendo considerada como diagnóstico definitivo, especialmente em áreas de alta prevalência de TB (Martins et al. 1977; Light et al. 1995; Ferrer 1997; Valdes et al. 2003).

Mesmo considerando esses dois critérios, cultura e exame histopatológico, o diagnóstico só é possível em aproximadamente 85% dos casos (Follador et al. 1991). Na prática clínica, essa eficácia pode ser menor e dados do município do Rio de Janeiro mostram que um grande número de casos (cerca de 50%) tem o tratamento específico instituído sem a confirmação do diagnóstico (Soares 2002).

1.8 Testes sorológicos usados em pesquisa para diagnóstico da TB

A sorologia para TB foi introduzida por Arloing em 1898, através de uma técnica de hemaglutinação, sendo esta positiva em 57% dos pacientes com TB pulmonar (Daniel & Debanne 1987). Em 1972, Engvall e Perlmann descreveram a técnica de ELISA. Essa técnica não requer instrumentos sofisticados e seus reagentes são de baixo custo (Daniel & Debanne 1987). Desde então, os testes sorológicos têm sido utilizados com o objetivo de diagnosticar a TB, sobretudo em pacientes incapazes de expectorar, com doença pulmonar mínima ou em casos de TB extrapulmonar (Daniel & Debanne 1987).

O teste ELISA baseia-se na utilização de antígenos expressos em grande quantidade pelo *M. tuberculosis*, purificados por técnicas especiais, em que são testados quanto à presença de anticorpos específicos, nos soros e/ ou outros fluidos. Esses ensaios incluem a dosagem, geralmente, de anticorpos da classe IgM, IgG e IgA, na tentativa de avaliar qual ou quais anticorpos são melhores secretados nas diferentes fases da doença, que possam caracterizar a TB (Sable et al. 2005) .

A primeira geração de testes para detecção de anticorpos foi baseada em misturas brutas de constituintes e produtos de *M. tuberculosis*, por exemplo, culturas de filtrados proteicos e derivados proteicos purificados, preparações usadas em testes tuberculínicos. Vários desses testes anteriores tinham baixa especificidade, assim como os testes que continham misturas de antígenos compartilhadas por diferentes espécies bacterianas (Laal & Skeiky 2005).

O aumento na compreensão da resposta imune humana ao *M. tuberculosis* e o advento de novas ferramentas genômicas e proteômicas possibilitaram o descobrimento de novos antígenos capazes de aumentar a especificidade e a sensibilidade dos ensaios, comparadas com a dos ensaios com os antígenos da primeira geração (Laal & Skeiky 2005).

Em 1990, Murate e colaboradores pesquisaram anticorpos IgM, IgG e IgA anti PPD de 31 pacientes com TBP e 39 com derrame pleural por câncer, observaram que a média das DO foi maior em TBP comparados aos pacientes com efusões carcinomatosas, alcançando uma sensibilidade de 22,6% e especificidade de 94,9%. Banchuim e colaboradores (1990), utilizando também o PPD para pesquisa em anticorpos IgG presentes no LP, não encontraram

diferenças estatísticas entre os grupos estudados, de 26 pacientes TBP e 11 pacientes com câncer, com sensibilidade de 12% e especificidade de 100%. A complexa estrutura antigênica do PPD contém muitos componentes heterogêneos que pode explicar os resultados acima.

Pesquisas recentes têm sugerido que os antígenos de baixo peso molecular apresentam melhor imunodominância, tais como o CFP-10, CFP-21, MPT-51, ESAT-6, MPT-63, MPT-64, GlcB, Hsp-X e o Antígeno 85, entre outros. Singh e colaboradores (2003) testaram um ensaio ELISA, para avaliar a resposta humoral de dois antígenos: MPT-32 e GlcB de pacientes com TB ativa. A sensibilidade do teste foi de 68% (MPT-52) e 75%(GlcB). Conde e colaboradores (2004) recrutaram pacientes com doença ativa e contatos para avaliação sérica de IgA e IgG contra o antígeno P-90 e observaram que a IgA apresentou melhor sensibilidade (74%) e especificidade (68%), em relação a IgG, com sensibilidade (69%) e especificidade (64%).

Wang e colaboradores (2005) mostraram a resposta a anticorpos IgM aos antígenos CFP-21, ESAT-6, MPT-63 e MPT-64, obtendo sensibilidade de 34,6%, 60,3%, 52,6% e 78,2% respectivamente. Para o anticorpo IgG de 46,2%, 64,1%, 93,6%, 57,7%. Quando o ensaio foi realizado com todos os antígenos associados, essa porcentagem subiu para 96,2% (IgM) e 84,6% (IgG), sugerindo que a combinação de um ou mais antígenos aumentam a acurácia do teste.

Outro estudo utilizando o ensaio ELISA, para analisar o perfil de várias subclasses de IgG específicos ao antígeno ES-31, em diferentes pacientes com TB, mostra-se que os anticorpos IgG1 e IgG3 específicos a essa serina

protease estão aumentados, sugerindo o seu uso como marcador de doença ativa (Gupta et al. 2005).

A imunocromatografia é também um teste sorológico rápido que pesquisa anticorpos específicos para antígenos do *M. tuberculosis*, porém apresenta a desvantagem do custo elevado. Um teste de imunocromatografia está em teste comercial, fase III do ensaio clínico, detecta anticorpos IgG contra antígenos de *M. tuberculosis* usando sangue total, plasma e soro. Os melhores resultados foram obtidos na dosagem realizada no soro, com sensibilidade de 65% e especificidade de 67% (Gounder et al. 2002).

Em 2008, Olival pesquisou a resposta imune humoral, anticorpos IgM contra o antígeno GlcB e MPT-51, de 80 pacientes TBP e 39 NTBP, a sensibilidade encontrada dos ensaios com o LP foi de 30% e 22,5% para o antígeno GlcB e MPT-51, respectivamente e os ensaios com o soro de 29% e 12% para o GlcB e MPT-51, respectivamente, para especificidade de 95%. Quando os resultados foram combinados, houve um aumento de 15% na sensibilidade (45%) para a especificidade de 87,2%.

A detecção de imunoglobulinas (Ig) é relativamente simples e barata e por isso o sorodiagnóstico para TB tem sido extensivamente investigado. O ELISA é uma técnica sensível, reprodutível, rápida, segura, de fácil execução e não requer instrumentos sofisticados e caros, o que quer dizer que pode ser facilmente realizada em qualquer laboratório. O uso de antígenos purificados, juntamente com essa técnica, já foi provado que é uma excelente opção para o sorodiagnóstico da TB. (Chiang et al. 1997; Demkow et al. 2004; Okuda et al. 2004; Almeida et al. 2008). Esses testes também já mostraram seu potencial para o diagnóstico da TB extrapulmonar (Steingart et al. 2007).

II – Justificativa

“Diagnosticar um doente tuberculoso, particularmente um *bacilífero* (doente que, ao tossir, elimina bacilos no ambiente), e tratá-lo corretamente, curando-o, é eliminar uma fonte de infecção. Reduzir as fontes de infecção quebra a cadeia de transmissão da doença e diminui o problema da tuberculose na comunidade e no mundo”.

Hisbello S. Campos

A base dos programas para o controle da TB consiste em um diagnóstico preciso e de um tratamento conciso do paciente com TB ativa. O fator essencial para contenção da doença está na habilidade do diagnóstico precoce, já nos estágios iniciais (Domínguez et al. 2009).

As mortes por TB, hoje, são decorrentes principalmente do diagnóstico tardio da doença, concentrando-se nos grupos mais desfavorecidos da sociedade e que possuem, portanto, menor acesso aos serviços de saúde. Estima-se que, nos países desenvolvidos, o prazo mínimo de diagnóstico de um doente por TB seja de 3 meses (Harries et al. 2001). Nos países em desenvolvimento, a demora é muito maior e, o que conseqüentemente, produz um elevado número de infectados e de doentes (Ministério Da Saúde, 2002). Diagnosticar e tratar o mais rápido possível a TB é medida prática para salvar vidas e recuperar a saúde dos enfermos (Hino et al. 2007).

A TBP representa aproximadamente 8 % de todas as enfermidades associadas à infecção por *M. tuberculosis* (Seibert et al. 1991). Constitui a primeira causa de derrame pleural em áreas com elevada prevalência por TB

(Promkiamon 1997). Na cidade do Rio de Janeiro (RJ), por exemplo, a TB é responsável por cerca de metade dos derrames pleurais (Neves 1992; Silva 2000; Neves et al. 2004) .

O diagnóstico da TBP é usualmente mais difícil e problemático do que o da TB pulmonar (American Thoracic Society 2000; Brodie And Schluger 2005).

O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura com a identificação da espécie. Entretanto o resultado, além de demorado, tem uma sensibilidade apenas razoável (Seibert et al. 1991; Light 1995; Neves et al. 2004). A pesquisa direta, por exemplo, de bacilo álcool-ácido resistente no LP pelo método de Ziehl-Neelsen, ou similar, é positiva em menos de 5% dos casos, e a cultura em meio de LJ não ultrapassa 40% de positividade (Light 1999). Em razão disso, a presença de granuloma com necrose caseosa é aceita como critério de diagnóstico de certeza e a presença do granuloma inespecífico, ou seja, sem o padrão de necrose, vem sendo considerada como diagnóstico definitivo, especialmente em áreas de alta prevalência da TB (Neves et al. 2004). Mesmo considerando esses dois critérios, cultura e exame histopatológico, o diagnóstico só é possível em aproximadamente 85% dos casos (Follador et al. 1991; Neves et al. 2004).

A combinação da biópsia pleural e a cultura do LP podem aumentar a sensibilidade para até 95%. No entanto, representa um método de diagnóstico invasivo, que requer tempo (mínimo de três semanas) e elevado custo benefício. Além do mais, esse procedimento se torna inviável para a maioria dos centros de atendimento no Brasil, porque demanda estrutura tempo, dinheiro e preparo dos trabalhadores da saúde (Donath 1997).

Estudo realizado no ano de 2006 em pacientes com TB extrapulmonar mostrou que em vários casos de TBP, a estadia prolongada dos pacientes nos hospitais está diretamente associada ao diagnóstico tardio (Arciniegas & Orjuela 2006).

Mesmo com o advento da aplicação de novas técnicas diagnósticas, atualmente desenvolvidas, cerca de 10% a 20% dos derrames pleurais permanecem sem diagnóstico etiológico definido depois de esgotados os métodos diagnósticos disponíveis (Villena et al. 2002). Dentre esses novos métodos, por exemplo, a dosagem da adenosina desaminase (ADA) tem merecido destaque em razão de sua alta sensibilidade (>90%). A quase totalidade dos estudos comprovou sua utilidade e recomenda seu uso na rotina de investigação da TBP, mesmo em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana, especialmente nas áreas de alta prevalência da doença (Fiuza 1997; Riantawan et al. 1999). Em virtude da sua moderada especificidade (em torno de 85%), o método não permite o diagnóstico de modo isolado, e a associação com outros critérios clínicos e laboratoriais tem sido sugerida, no intuito de melhorar o rendimento do teste (Fiuza 1997; Valdes et al. 1993; Riantawan et al. 1999; Silva 2000). No entanto, não existe uma associação de critérios nem um valor de probabilidade aceito para tal propósito.

Embora o derrame pleural tuberculoso seja, *per se*, uma situação de pouca morbidade e de mortalidade desprezível, deve ser diagnosticada e tratada adequadamente. Por conseguinte, prevenir danos ao paciente, como espessamento pleural residual e, o que é mais grave, o posterior surgimento de TB pulmonar e extrapulmonar, a chamada TB pós-pleurítica.

A TBP é uma doença potencialmente curável se a acurácia do diagnóstico for realizada e a quimioterapia instituída efetivamente durante o estágio ativo da doença (Anie et al. 2007). No atual momento, os testes diagnósticos podem ser a fonte de maior economia nos serviços de saúde. Testes rápidos e acurados é a chave para tratamentos efetivos e redução dos custos. Em função de todo o exposto, há a necessidade de se desenvolver um diagnóstico eficaz, rápido e barato para pacientes portadores de TBP.

III – Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Deduzir a acurácia de um ensaio imunoenzimático (ELISA) com o antígeno recombinante de 16 KDa, Hsp-X, para diagnóstico de TBP.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a sensibilidade e a especificidade do ELISA, utilizando o antígeno recombinante de *M. tuberculosis*, Hsp- X, para detecção de anticorpos da classe IgM do soro e do LP;
- Estimar a sensibilidade e a especificidade do ELISA, utilizando o antígeno recombinante do *M. tuberculosis*, Hsp- X, para detecção de anticorpos da classe IgG do soro e do LP;
- Estimar a sensibilidade e a especificidade do ELISA, utilizando o antígeno recombinante do *M. tuberculosis*, Hsp- X, para detecção de anticorpos da classe IgA do soro e do LP.

IV – Material e Métodos

4.1 Modelo do estudo

Acurácia de um teste ELISA

4.2 População de referência

Pacientes com derrame pleural

4.3 População em estudo

No período de setembro de 2002 a abril de 2007 foram avaliados no Setor de Métodos Especiais (SME) do Instituto de Doença do Tórax (IDT) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 249 indivíduos com suspeita de derrame pleural, dos quais 74 não preencheram critérios de elegibilidade (30 não tinham quantidade suficiente de LP para a amostra do estudo, 34 indivíduos não tinham derrame pleural, 5 indivíduos não assinaram o termo de consentimento e em 5 indivíduos ocorreram problemas técnicos no manuseio das amostras). Foram incluídos no estudo 175 pacientes. Destes, 43 foram excluídos do estudo pelos seguintes motivos: 13 não foram submetidos ao ELISA das amostras de sangue devido à hemólise e 30 o diagnóstico final foi desconhecido. Assim, foram analisados os dados de 132 indivíduos, dentre os quais 97 apresentaram o diagnóstico final de TBP e 35 apresentaram outro diagnóstico diferente de

TBP. Conforme a Figura 2, a distribuição dos não TBP foram pacientes com câncer, pneumonia, lúpus eritematoso sistêmico, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência hepática.

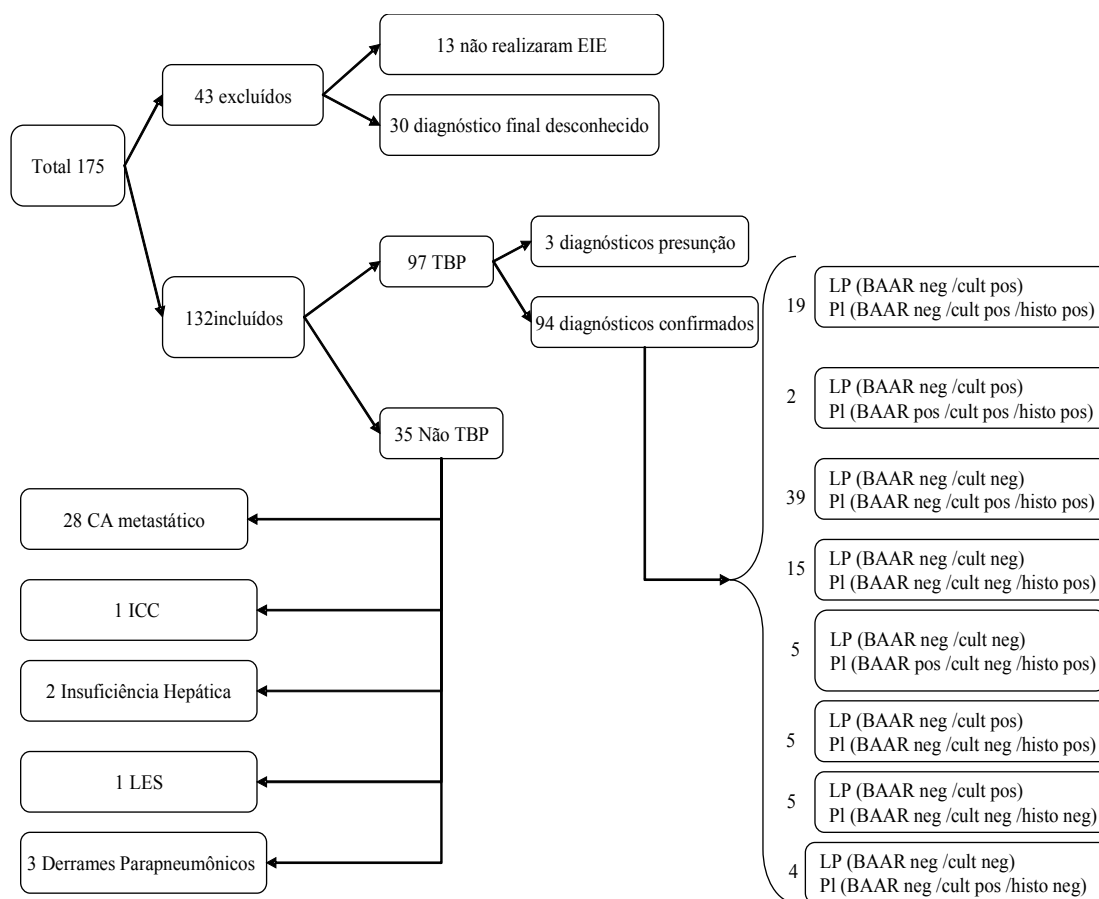


Figura 2. Fluxograma dos indivíduos recrutados para o estudo

TBP = tuberculose pleural; Não TBP = não tuberculose pleural; LP = líquido pleural; PI = fragmento de pleura; BAAR = bacilo-álcool-ácido-resistente; BAAR pos = bacilo álcool-ácido-resistente positivo; BAAR neg = bacilo-álcool-ácido-resistente negativo; cult pos = cultura positiva para tuberculose; cult neg = cultura negativa para tuberculose; histo pos = histopatologia positiva para tuberculose; histo neg = histopatologia negativa para tuberculose; CA = câncer; ICC = insuficiência cardíaca congestiva; LES = lúpus eritematoso sistêmico.

4.4 Seleção da amostra

Os critérios de inclusão usados nesse estudo foram ausência de tratamento para TB, realização de toracocentese com biópsia pleural e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Os critérios de exclusão foram toracocentese branca ou biópsia pleural sem fragmento, não realização de ELISA no soro e/ou no LP e diagnóstico final da doença desconhecido.

4.5 Toracocentese e biópsia pleural

A toracocentese, as telerradiografias e a biópsia pleural foram realizadas pelos médicos assistentes do SME do IDT do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) seguindo a rotina do Instituto do Tórax/HUCFF da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O procedimento seguiu a técnica de Cope.

Um frasco do LP com 5 ml e cinco amostras de fragmentos pleurais foram enviados para o Laboratório de Micobacteriologia do HUCFF da UFRJ para serem submetidos à pesquisa direta de Bacilos Álcool Ácidos Resistentes (BAAR) e a cultura para micobactéria. Dois fragmentos pleurais e um frasco de LP de 5 ml foram encaminhados para o Setor de Anatomia Patológica para análise histológica e citológica para células malignas. Dois frascos com 500 µl, de soro e de LP, foram enviados ao Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) para a realização do ELISA.

4.6 Indução do escarro/ Prova tuberculínica

A indução do escarro foi feita através de nebulização com solução salina a 3% em nebulizador ultra-sônico. A prova tuberculínica foi feita com 2 UT do derivado protéico Rt-23, sendo a aplicação intradérmica efetuada na face anterior do antebraço esquerdo, segundo a rotina do Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar do HUCFF/UFRJ.

4.7 Antígeno Recombinante

O antígeno recombinante Hsp-X de *M. tuberculosis*, foi produzido em *E. coli*, pelo laboratório de pesquisa na Universidade Estadual do Colorado (CSU) e fornecidos ao Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, mediante convênio firmado com a Universidade Federal de Goiás, contrato número NOI- AI-75320.

4.8 Anticorpos (conjugados)

Anti IgG: anticorpo monoclonal de coelho, anti-IgG humana conjugada com peroxidase (IgG-HRP, BIO-RAD, São Francisco, California) diluído 1/5000 para uso no teste de ELISA indireto.

Anti IgM: anticorpo monoclonal de cabra, anti-IgM humana conjugado com peroxidase (IgM-HRP, ZYMED, São Francisco, Califórnia, USA) diluído 1/5000 para uso no teste de ELISA indireto.

Anti IgA: anticorpo monoclonal de cabra, anti-IgA humana conjugada com peroxidase (IgA-HRP, SOUTHERNBIOTECH, Canadá, USA) diluído 1/2000 para uso no teste de ELISA indireto.

4.9 Teste imunoenzimático para detecção de IgM, IgG e IgA do soro e do LP.

A detecção de anticorpos da classe IgM, IgG e IgA contra o antígeno recombinante Hsp-X do LP e do soro foram realizadas seguindo a técnica de ELISA conforme Avrameas et al. (1979), com algumas modificações após padronização pelo Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas.

Para padronização dos ensaios as amostras foram distribuídas em diferentes concentrações, variando de 1/5 a 1/1000, assim como o conjugado contendo o anticorpo ligado à peroxidase, o mesmo foi testado em quatro concentrações, 1/2000, 1/3000, 1/5000 e 1/6000, tanto para IgM, quanto para IgG e IgA. O melhor tempo de incubação das amostras, em estufa a 37°C, também foi efetuado, principalmente quando o LP foi padronizado, as amostras foram incubadas em diferentes períodos, de 12h, 16h e 24 h. O protocolo com o melhor resultado foi seguido.

Para a realização do ensaio o antígeno foi adicionado em placas próprias para ELISA, de poliestireno contendo 96 poços do laboratório Corning Incorporated Costar®. Nessa fase, o mesmo, foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato com pH 9,6, em uma concentração final de 2,5 µg/ml (50µl/ poço) e incubado por 18 horas a 4°C. Posteriormente, acrescentou-se 50 µl de tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, com leite desnatado em pó a 1% e por mais 2

horas as placas foram mantidas à temperatura de 37°C. Após o bloqueio realizou-se uma lavagem com PBS para em seguida, adicionar o soro e ou LP. O soro e o LP foram diluídos em PBS, leite desnatado a 0,1% diluição de 1/100 e 1/10, respectivamente. Finalizadas as diluições, as amostras foram distribuídas (50 µl/ poço), em duplicata, nas placas e incubadas. Para avaliação de amostras séricas, as placas foram incubadas por 2 horas em estufa a temperatura de 37 °C, e para avaliação do LP por 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS, Tween 20 a 0,05%. As soluções contendo os anticorpos anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA totais humanas conjugadas com peroxidase foram diluídas em PBS, leite desnatado a 0,05%, em uma diluição final de 1/5000, 1/5000 e 1/2000 para IgM, IgG e IgA, respectivamente, distribuídas em cada poço (50 µl) e incubadas, mais uma vez em estufa a 37°C por 1 hora. Após 1 hora, as placas foram novamente lavadas com PBS e Tween 20 a 0,05%.

O tampão substrato, composto de uma solução contendo 5 mg de **orto**-fenileno-diamina (OPD) e 20 µl de peróxido de oxigênio (30 volumes) diluídas em 5 ml de tampão citrato-fosfato, com pH 5,2 foi pipetado em cada orifício das placas e estas incubadas por 15 minutos, ao abrigo da luz. Finalmente, 50 µl de solução ácido sulfúrico 4N foram adicionados em cada poço. Os resultados dos testes de ELISA foram fornecidos em forma de valores de densidade óptica (DO), obtidos em leitor de ELISA (*Thermo Systems Multiskan*), com comprimento de onda de 492 nanômetros.

4.11 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo: Programa Prism versão 4.02 (2002) e Excel (2003) para elaboração dos gráficos, tabelas e análise estatística dos resultados. Assumiu-se uma distribuição não paramétrica das amostras, adotou-se um intervalo de confiança de 95% e comparou-se os grupos TBP e NTBP utilizando o teste de Mann-Whitney. Para a determinação do ponto de corte das reações de ELISA, sensibilidade e especificidade, utilizou-se a curva **característica** de operação do receptor (ROC).

4.12 Aspectos éticos deste estudo

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 05/09/02 com protocolo de pesquisa n° 137/01- CEP (Anexo 6).

V. RESULTADOS

5.1. Dados sócio-demográficos da população em estudo

A Tabela 1 mostra o perfil sócio-demográfico dos indivíduos incluídos nesse estudo. Um total de 97 pacientes com TBP foram comparados com os pacientes do grupo controle (NTBP), dos quais 28 apresentaram câncer metastático, um insuficiência cardíaca congestiva, dois insuficiência hepática, um lúpus eritematoso sistêmico e três derrames parapneumônicos. A maioria dos pacientes TBP, 83,50%, confirmou vacinação pela BCG, grande parte era do sexo masculino, 71,13% (69/97), com mediana de idade de 33 (16-70) anos. Dos pacientes NTBP, 57,42% (20/35), confirmaram vacinação pela BCG, 60% (21/35) dos pacientes eram do sexo masculino, com mediana de idade de 61 (17-94) anos.

O teste tuberculínico (PPD RT 23, usado no Brasil), avaliado pela técnica de Mantoux, foi realizado em 38 indivíduos do grupo TBP e nove do grupo NTBP. Entre os pacientes com TB ativa, quatro foram reatores fortes, ou seja, apresentaram endureção maior que 10 mm e entre os pacientes NTBP, em três indivíduos, a leitura foi também maior que 10 mm.

Foi realizado escarro induzido (EI) em 44 indivíduos cujo resultado foi positivo para BAAR em 2 amostras e em 10 amostras demonstraram cultura positiva para TB em meio próprio de LJ. Não foram realizadas EI em 88 indivíduos recrutados para o estudo. Não houve complicações quanto ao procedimento de toracocentese e biópsia pleural nos grupos estudados.

Tabela 1. Dados sócio-demográficos da população em estudo.

Grupos	NTBP n = 35	TBP n = 97
Sexo (M/F)	21/14	69/28
Mediana de Idade	61 (17-94)	33 (16-70)
BCG (S/N/NR)	20/13/2	81/8/8
PT (S/N/NR)	9/25/1	38/53/6

TBP = Tuberculose Pleural; Não-TBP = Não-Tuberculose Pleural; BCG = Bacilo de Calmette Guérin; PT = Prova Tuberculínica; NR = Não Realizado.

5.2 Reconhecimento do antígeno recombinante Hsp-X por anticorpos IgM séricos e pleurais dos pacientes com TBP pelo ensaio de ELISA

Na Figura 3 são apresentadas os resultados obtidos após análise por ELISA dos anticorpos da classe IgM, do soro e do LP, específicas para o antígeno recombinante Hsp-X, de pacientes TBP e NTBP. O ensaio para pesquisa de IgM do soro não foi considerado pois a leitura foi próxima de zero, $0,039 \pm 0,05$ (TBP) e $0,012 \pm 0,008$ (NTBP), o que quer dizer que não foi detectado anticorpos específicos ao Hsp-X em pacientes com TBP e NTBP (Figura 3A).

Foi detectado uma maior quantidade de anticorpos IgM específicos ao Hsp-X, no LP (Figura 3B), de pacientes com TBP em comparação ao grupo NTBP.

As médias e os respectivos desvio padrões do ensaio para IgM do LP foram de $0,25 \pm 0,144$ e $0,14 \pm 0,09$ para os grupos TBP e NTBP ($p < 0,05$). O VPP do ensaio para detecção de IgM do LP foi de 82% e o VPN de 43%.

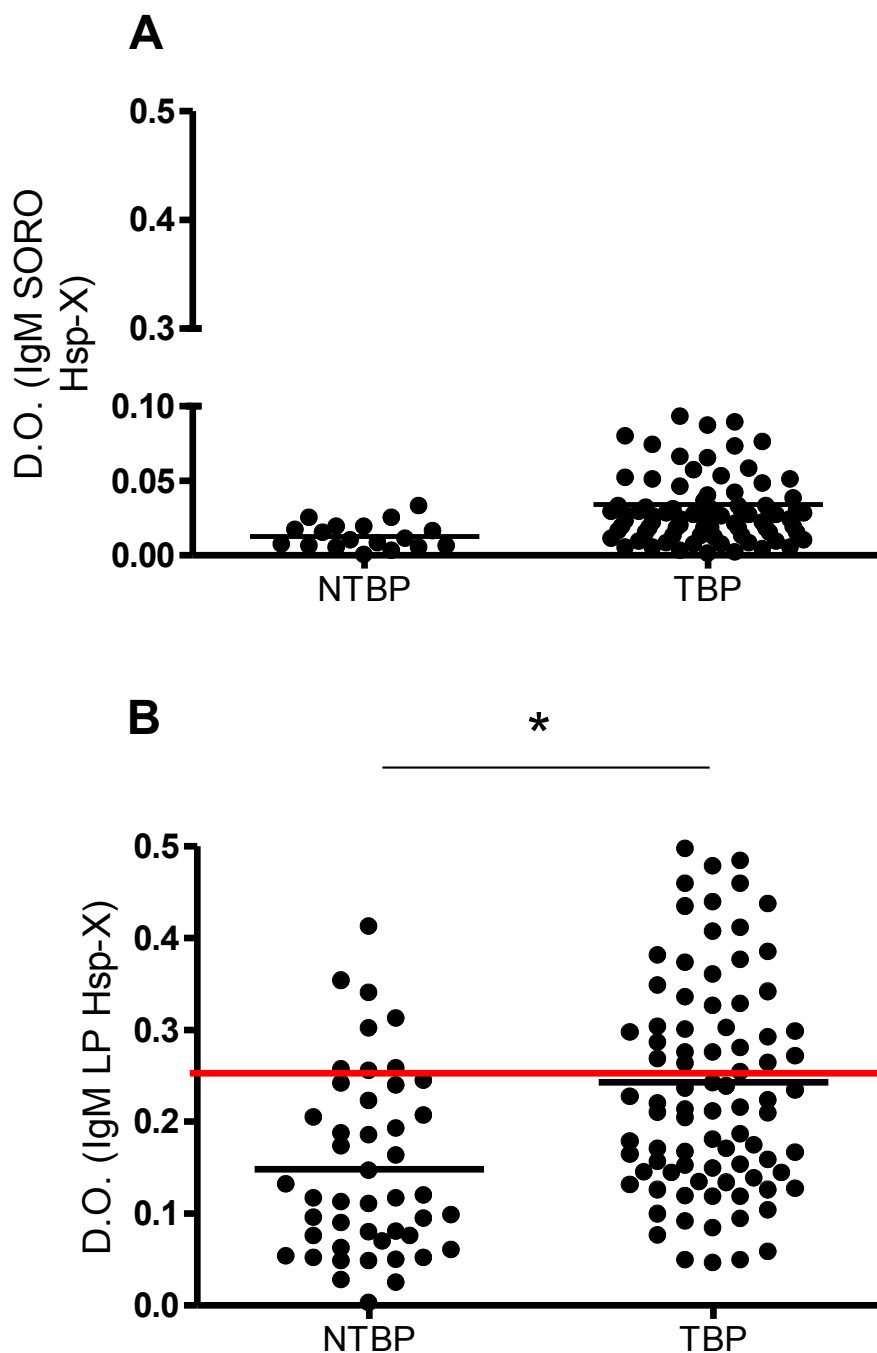


Figura 3. Níveis séricos de IgM anti- rHsp-X do soro e do LP de pacientes com e sem TBP. As médias das DOs de todas as amostra de soro (A) e LP (B) dos pacientes com TBP e controles, de pacientes NTBP, foram comparadas. Os pontos no gráfico correspondem à leitura de cada amostra, diluídas em 1/100 e 1/10 para o soro e LP, respectivamente, medidas pelo ELISA: 2,5 µg/ml de antígeno rHsp-X e anticorpo anti-IgM humana conjugado à peroxidase diluído em 1/5000. A barra horizontal em cada gráfico representa o ponto de corte, do ensaio. * $p < 0,05$.

5.3 Reconhecimento do antígeno recombinante Hsp-X por anticorpos IgG séricos e pleurais dos pacientes com TBP pelo ensaio de ELISA

Na Figura 4 são apresentadas os resultados das DO dos ensaios que avaliaram a presença da IgG, do soro e do LP, específica para o antígeno recombinante Hsp-X, de pacientes TBP e NTBP. Anticorpos IgG tanto do soro (Figura 4A) quanto do LP (Figura 4B), que reconhecem o antígeno Hsp-X, no ensaio ELISA, não distinguiram pacientes TBP e não TBP, a média das DOs desses ensaios foram semelhantes, de $0,0661 \pm 0,07$ para pacientes TBP e $0,089 \pm 0,095$ NTBP para IgG do soro e $0,133 \pm 0,1$ para pacientes TBP e $0,13 \pm 0,17$ para NTBP para IgG do LP.

O VPP do ensaio para pesquisa de IgG do soro foi de 61% e o VPN de 22%. O ensaio para pesquisa de IgG do LP teve o VPP de 64% e 30% o VPN.

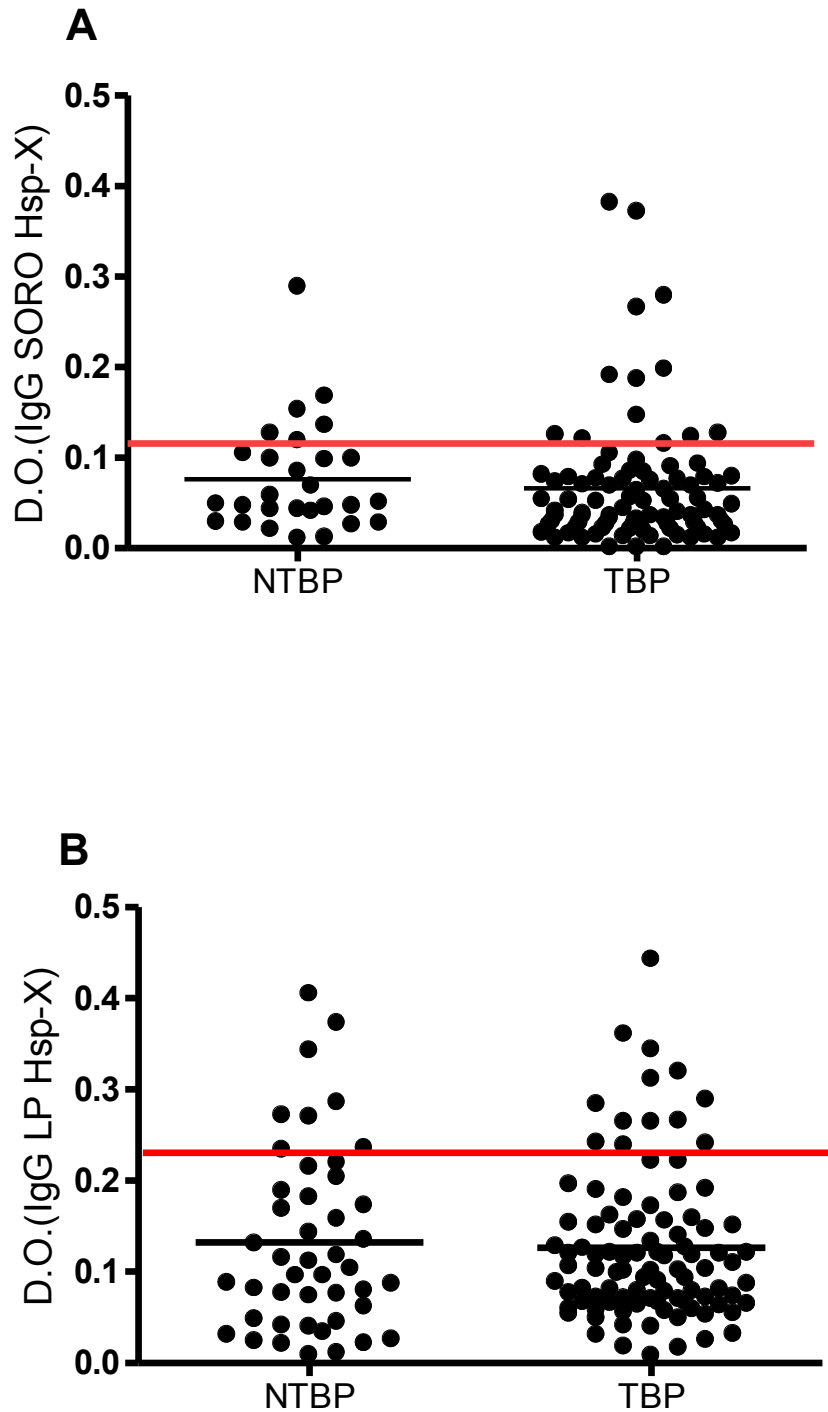


Figura 4. Níveis séricos de IgG anti- rHsp-X do soro e do LP de pacientes com e sem (TBP). As médias das DOs de todas as amostra de soro (A) e LP (B) dos pacientes com TBP e controles, de pacientes NTBP, foram comparadas. Os pontos no gráfico correspondem à leitura de cada amostra, diluídas em 1/100 e 1/10 para o soro e LP, respectivamente, medidas pelo ELISA: 2,5 µg/ ml de antígeno rHsp-X e anticorpo anti-IgG humana conjugado à peroxidase diluído em 1/5000. A barra horizontal em cada gráfico representa o ponto de corte do ensaio.

5.4 Reconhecimento do antígeno recombinante Hsp-X por anticorpos IgA séricos e pleurais dos pacientes com TBP pelo ensaio de ELISA

Na Figura 5 são apresentadas os resultados dos valores das DO dos ensaios que avaliaram a presença da IgA, do soro e do LP, específica para o antígeno recombinante Hsp-X de pacientes TBP e NTBP. Os níveis de anticorpos IgA presente no soro (Figura 5A) de pacientes TBP foi mais pronunciado em pacientes TBP em relação ao grupo controle, NTBP, a média das DO com o DP foi de $0,244 \pm 0,377$ e $0,137 \pm 0,174$ para o grupo TBP e NTBP, respectivamente, porém os resultados não foram estatisticamente diferentes. Pacientes com TBP apresentam também maiores níveis de IgA no LP anti Hsp-X do que indivíduos que apresentam derrame pleural por outras enfermidades (Figura 5B). Comparando-se as médias das DO dos dois grupos (TBP= $0,481 \pm 0,3$ e NTBP= $0,203 \pm 0,204$), pacientes com TBP apresentaram níveis de IgA anti Hsp-X significativamente maiores ($p < 0,05$).

Para o ensaio que utilizou o soro, o cálculo do VPP foi de 84% e o cálculo do VPN de 32%. Usando o mesmo cálculo, obteve-se um VPP de 87% e 47% VPN para o ensaio com o LP.

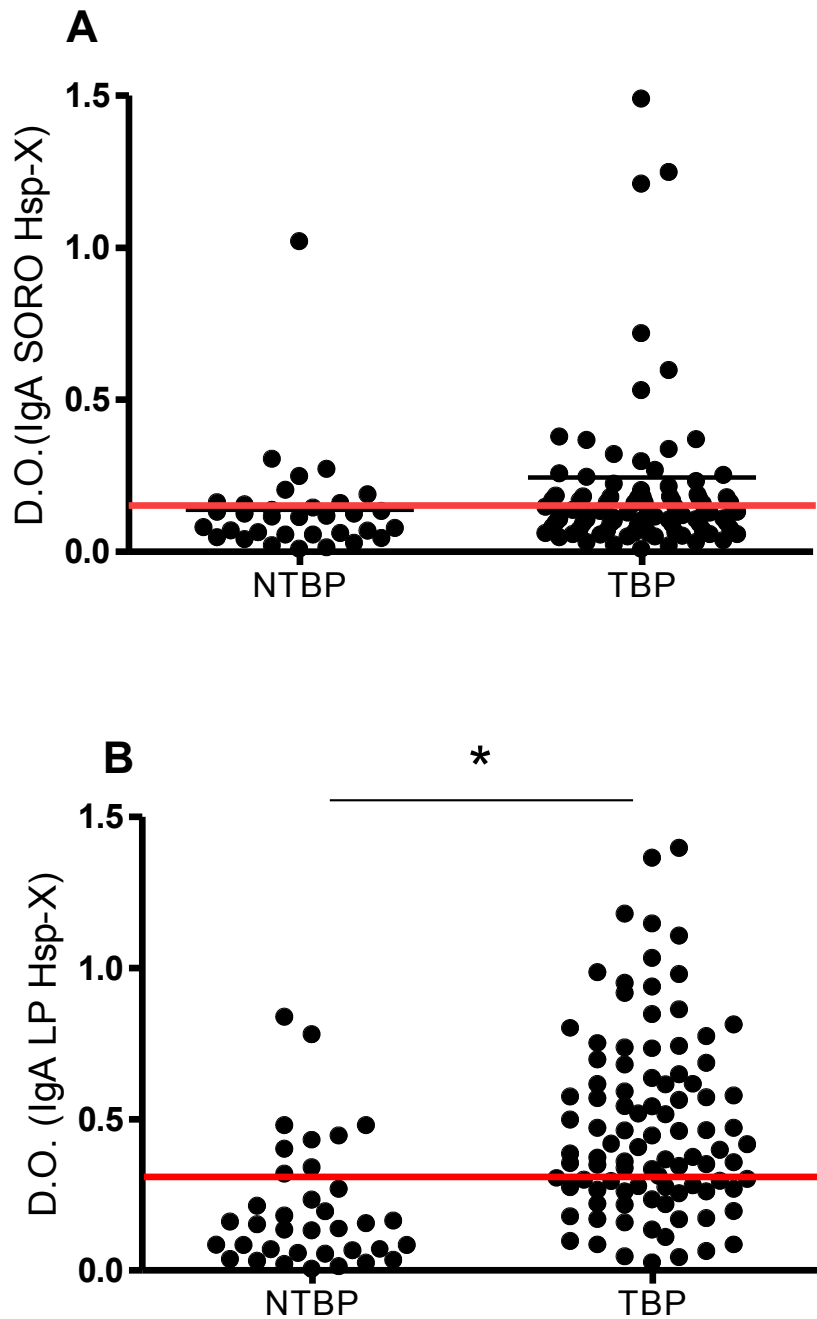


Figura 5. Níveis séricos de IgA anti- rHsp-X do soro e do LP de pacientes com e sem TBP. As médias das DOs de todas as amostra de soro (A) e LP (B) dos pacientes com TBP e controles, de pacientes NTBP, foram comparadas. Os pontos no gráfico correspondem à leitura de cada amostra, diluídas 1/50 e 1/5 para o soro e LP, respectivamente, mediadas pelo ELISA: 2,5 µg/ ml de antígeno rHsp-X e anticorpo anti-IgA humana conjugado à peroxidase diluído em 1/2000. A barra horizontal em cada gráfico representa o ponto de corte dos ensaios. * $p < 0,05$

5.5 Determinação da sensibilidade e especificidade dos ELISAS propostos.

Utilizando-se os valores das densidades óticas, obtidos de cada indivíduo em cada um dos ensaios, foi possível elaborar uma curva ROC que prediz a sensibilidade de cada ensaio, dentro de um ponto de corte sugerido pela curva.

Sendo assim, para a especificidade fixa de 83% o ELISA indireto que avaliou os anticorpos da classe IgA anti-Hsp-X do LP apresentou sensibilidade de 65%, apresentando portanto, melhor eficácia quando comparado aos demais testes (Tabela 2).

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade dos testes imunoenzimáticos com IgM, IgG e IgA do soro e do LP, obtidos através da curva ROC

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor do DO do ponto de corte
IgM			
Soro	ND	ND	ND
LP	42	83	0,254
IgG			
Soro	13	83	0,117
LP	16	83	0,221
IgA			
Soro	39	83	0,159
LP	65	83	0,302

ND= Não determinado

VI. Discussão

Nosso estudo inclui homens e mulheres com derrame pleural a esclarecer, em que foram elegíveis 132 indivíduos, dentre os quais 97 apresentaram o diagnóstico final de TBP e 35 apresentaram diagnóstico final diferente de TBP. O diagnóstico de TBP foi confirmado pela cultura do LP, baciloscopia e cultura do fragmento pleural em 96,9% (94/97) dos casos de TBP e 3,09% diagnósticos de presunção (3/97). Os indivíduos classificados no grupo de TBP apresentaram uma mediana de idade de 33 anos, 71% eram do sexo masculino e 83,5% foram vacinados pela BCG. Todos esses dados concordam com dados da literatura, em que há uma prevalência maior da faixa etária mais jovem para os casos de TBP, enquanto que há uma prevalência maior de doenças malignas para faixa etária mais idosa (Valdes et al. 2003).

Ainda concordando com os achados, Steingart e colaboradores (2007), após avaliarem 3720 citações, em recente meta-análise, concluíram que a média de idade para pacientes com TB extrapulmonar gira em torno de 35 anos (com intervalo entre 30 a 56 anos), faixa etária jovem. No que diz respeito ao sexo, a OMS (2009), após considerar 2,55 milhões de notificações de pacientes com TB, observou que 1,65 milhões eram do sexo masculino e 0,9 milhões eram do sexo feminino. No entanto, em se tratando de TB extrapulmonar esses números não variam muito de homem para mulher, pois em 101 países que notificaram esse tipo de caso à OMS, o que representa 50% do total existente, 195 022 foram do sexo masculino e 180 310 do sexo feminino, dando uma proporção de 1:1.

As razões pelas quais as taxas de notificação da TB podem ser mais elevadas nos homens do que nas mulheres são mal entendidas. Possíveis explicações incluem diferenças nos papéis sociais de homens e mulheres e ou

diferenças biológicas entre homens e mulheres em determinada faixa etária, o que afeta diretamente o risco de serem infectados, assim como o risco de a infecção evoluir para uma doença ativa. A constatação de que a taxa de notificação tende a ser semelhante entre homens e mulheres em países com uma elevada prevalência do HIV suporta a hipótese de diferenças biológicas, que pode ser diminuída pela supressão imunológica devido ao HIV. Outros fatores, todavia, não biológicos podem desempenhar um importante papel, tal como a preocupação em que as mulheres têm em buscar o serviço de saúde em relação aos homens. As razões que compreendem as diferenças e suas implicações requerem uma investigação mais aprofundada (WHO 2009).

Os níveis de anticorpos IgM do LP contra o antígeno recombinante Hsp-X nos pacientes com TBP, dosados por ELISA foram mais elevados do que os níveis de IgM dos pacientes com derrame pleural por outras doenças. Anticorpos IgG, tanto do soro quanto do LP, que reconhecem o antígeno Hsp-X, no ensaio ELISA, não distinguiram pacientes TBP e não TBP. O ensaio ELISA empregando para pesquisa da IgA do LP foi eficaz em discriminar pacientes TBP e NTBP.

A sensibilidade baixa dos ensaios ELISA, pode estar associada à possibilidade de que alguns dos nossos controles negativos tenham entrado em contato prévio com *M. tuberculosis* (assim como outras micobactérias ambientais) ou apresentarem uma TB subclínica (Raja et al. 2004). Visto que o Rio de Janeiro é o estado com maior incidência de casos do Brasil (83,8/100 mil habitantes para TB, somente em 2005) (MS 2007), região endêmica e essa população ser mais exposta ao bacilo, justifica as elevadas leituras para os controles NTBP, por conseguinte, pontos de cortes também elevados e

sensibilidades baixas. Observando o nosso grupo de estudo verificamos que em sete pacientes controles (NTBP) que realizaram o teste tuberculínico, em três o resultado foi reator forte, ou seja, maior que 10 mm de endureção, o que sugere que esses pacientes entraram em contato com o agente causador da TB.

Apesar disso, Kunter et al. (2003) sugerem que, em locais onde a prevalência da TB é alta e a cobertura pela BCG é comum, a avaliação através do LP facilitaria no diagnóstico desses pacientes. Em seu estudo, ao avaliarem o antígeno A60 de 88 pacientes com TBP, obtiveram uma sensibilidade de 77% e especificidade de 94% para pesquisa de IgM e sensibilidade de 42% e especificidade de 76% para IgG do LP.

As conclusões de Kunter e seus colaboradores são refletidos pelo fato da TBP ser uma patologia difícil de diagnosticar. O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura com identificação da espécie e possui um rendimento baixo, pois na TBP a quantidade de bactéria na amostra presentes no LP é desprezível. Segundo Sahn (1988), a identificação de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) no LP é próxima de zero e pode alcançar no máximo 10%, enquanto que a cultura do LP é positiva em torno de apenas 25 a 75% dos pacientes. Em trabalho realizado por Conde e colaboradores (2003), por exemplo, que avaliaram o rendimento da cultura do EI para o diagnóstico da TBP de 84 pacientes com TBP e 29 com outras doenças, observou-se um rendimento de apenas 52%, mesmo assim concluíram que esse método apesar de não substituir a biópsia pleural, pode ser usado para diagnosticar pacientes suspeitos especialmente onde não há acesso à biópsia e a exames histopatológicos.

A sensibilidade do ensaio pode variar também conforme o isótipo da Ig pesquisada (Araujo et al. 2008). Nosso estudo mostrou que o melhor resultado encontrado foi do ensaio para pesquisa de IgA, com uma sensibilidade de 65%, seguida pelo ensaio com IgM com sensibilidade de 42% e por fim, o ensaio com a IgG de 16%. Entretanto, em recente meta-análise, de 2009, Steingart e seus colaboradores avaliaram a eficácia dos ensaios sorológicos para as mesmas três classes de imunoglobulinas no sorodiagnóstico (IgA, IgG e IgM). Por meio dessa pesquisa, observou-se que os ensaios com a IgG tiveram a melhor sensibilidade, o que quer dizer que em 151 estudos avaliados, a média de sensibilidade dos ensaios foi de 61% (com variação de 8 a 100), em segundo lugar ficou a IgA, em 25 estudos analisados, a média da sensibilidade dos ensaios encontrada foi em torno de 40% (com variação de 10 a 90), por último a IgM, em 24 estudos a média da sensibilidade dos ensaios foi de apenas 11 % (com variação de 2 a 71). A média da especificidade entre esses ensaios foi muito semelhantes, de 96% (variação de 26 a 100), 96% (com variação de 48 a 100) e 98% (variação de 89-100) para IgG, IgA e IgM, respectivamente, semelhante à especificidade dos nossos ensaios, de 83%. Por fim, a melhor união avaliada foi entre a IgG e a IgA, em 34 estudos a sensibilidade ficou por volta de 71 % (43 a 97) e especificidade por volta de 97 (85 a 100). Contudo esse estudo não cita os antígenos usados por eles.

Células B em diferentes sítios anatômicos sofrem mudanças de isótipos distintos. As células B nas mucosas e serosas, em especial, normalmente mudam para o isótipo IgA, que é a classe de anticorpo mais eficiente contra os microrganismos que o infectam por essa via. A mudança para a IgA é estimulada pelo TGF- β , citocina produzida por distintos tipos celulares (Abbas

& Lichtman, 2005). Visto que os níveis de TGF- β são mais elevados no soro e no LP de pacientes com TBP em relação aos pacientes por outras doenças (Seiscento et al. 2007), justifica-se, desse modo, a possível troca de isótipo para IgA pelas células B, e conseqüentemente, o aumento dos níveis de IgA no LP dos nossos pacientes com TBP. O que permitiu diferenciar TBP e NTBP.

Em outra meta-análise de Steingart e seus colaboradores (2007), após analisarem 21 diferentes estudos, os quais usaram amostras de pacientes com TB extrapulmonar, concluíram que apesar de os testes comerciais serem rápidos, simples e não invasivos, não há evidências vantajosas suficientes para serem usados no diagnóstico da TB extrapulmonar. Nesse mesmo estudo, a sensibilidade dos ensaios variou de 26% a 59%, enquanto a especificidade variou de 81% a 100%, para os ensaios em que o LP foi avaliado. No entanto, essa revisão possui uma série de limitações, o número de estudos avaliados não foi suficiente para tais conclusões, assim reconhece o autor. Adicionalmente, o número de antígenos testados foi muito pequeno, comparado com o repertório de antígenos micobacterianos existentes potencialmente imunogênicos.

Em pesquisas preliminares realizadas pelo laboratório de Raja et al. (2006), já se havia concluído, por meio de ensaio imunoblot, que as proteínas de 27 KDa e a proteína de 16 KDa (Hsp-X) são reconhecidas por soros de pacientes com TB ativa, e não por pacientes negativos. Apesar disso, em estudos anteriores, a resposta ao antígeno de Hsp-X foi mais pronunciada em contatos intradomiciliares do que em pacientes com TB ativa (Jackett et al. 1988). Em estudo mais recente, realizado por Silva et al. (2003), a resposta a esse antígeno também foi associada a pacientes com TB inativa (resultado da

cultura e ou raio X negativos), mas que possuíam um grande risco de contrair a doença. Adicionalmente, Rabahi e seus colaboradores (2007) ressaltaram que o Hsp-X é uma proteína de *M. tuberculosis* expressa diferentemente durante os estágios de infecção, isso porque, nos ensaios sorológicos, seus níveis foram mais elevados em pacientes recentemente infectados e por isso consideraram ser um excelente marcador de estados iniciais da infecção, ou seja, pacientes latentes com alta chance de adoecerem, mesmo em populações vacinadas com BCG. Esses achados sugerem, desse modo, que esse antígeno possui a competência de ser um indicador de risco para adoecer por TB e aponta o aumento da resposta imune, frente ao elevado crescimento bacteriano na TB ativa (Silva et al. 2003), e por isso seu uso no diagnóstico TBP possibilitou detectar grande parte dos pacientes com TBP, já nos estágios iniciais da infecção, principalmente quando a pesquisa de IgA do LP foi empregada.

Raja et al. (2006) avaliaram o perfil imunogênico de quatro diferentes antígenos, 38 KDa, 30 KDa, 27 KDa e 16 KDa (Hsp-X) de pacientes com TB pulmonar. Para tal, eles usaram um ensaio imunoenzimático, como no presente trabalho, e dosaram três Ig, IgA, IgM e IgG do soro desses pacientes. Para a IgG do soro específica, para o antígeno Hsp-X, a sensibilidade e a especificidade encontradas por eles foram mais elevadas que a nossa, de 62% e 100 %, respectivamente. Apesar disso, Raja e seus colaboradores (2006) observaram que os melhores resultados foram quando se uniu mais de um antígeno, a sensibilidade chegou a 95% para a combinação dos antígenos 38 KDa, 16 KDa e 30 KDa, com especificidade de 90%.

Desenvolver um teste de diagnóstico imunológico para TB apresenta um formidável desafio, em parte porque tanto o estágio da infecção quanto o tecido

envolvido podem alterar o perfil dos genes expressos pelo microorganismo e, desse modo, a resposta dos anticorpos a esses produtos gênicos. Pesquisas, durante a última década, disponibilizaram evidências amplas de que *M. tuberculosis* se adapta ao ambiente, alterando o perfil de vários genes. (Mcmurray 2001; Samanich et al. 2001; Singh et al. 2001; Talaat et al. 2004; Delogu et al. 2006). Conseqüentemente, anticorpos produzidos em resposta a TB pulmonar não são marcadores apropriados para o diagnóstico da TB extrapulmonar. Steingart e seus colaboradores (2007) observaram uma alta variabilidade da eficácia dos ensaios sorológicos em formas extrapulmonares. No estudo retrospectivo, a sensibilidade desses ensaios variou muito de 26% a 100%, assim como a especificidade, de 59 a 100%. Se observarmos nossos resultados, podemos perceber que somente a IgA teve um resultado diferente entre o soro e o LP, sendo que a sensibilidade encontrada no LP não foi tão alta quando analisada no soro.

Em 2007, Senol et al., na Turquia, país com moderada prevalência de TB (40 casos por 100.000 habitantes), estudaram a resposta imune de 179 pacientes com TB frente a dois antígenos bacterianos, de 38 KDa e o Hsp-X. Nesse estudo, pacientes com TB pulmonar e com TBP apresentaram os valores das DO significativamente mais elevados em relação aos pacientes de TB inativos (curados) e dos indivíduos controles, que nunca tiveram TB. Entre os pacientes de TB pulmonar e pleural não houve diferença significativa. Sendo assim, Senol et al. (2007) concluíram que a resposta humoral a antígenos micobacterianos pode ser um indicador significativo para TB ativa e, portanto, contribuir para o diagnóstico dessa patogenia. Além disso, Senol et al.

recomendam o uso desses antígenos no diagnóstico da TB extrapulmonar, a qual possui uma série de limitações para pesquisa bacteriológica.

Vários fatores podem interferir na sensibilidade e especificidade de um sorodiagnóstico. Ao se desenvolver reagentes para um ensaio altamente específico, inúmeras substâncias antigênicas de *M. tuberculosis* são requeridas. A purificação desses antígenos diretamente de *M. tuberculosis* é difícil, devido ao fato do rendimento celular ser baixo, ao crescimento do bacilo lento e à virulência natural do organismo alta. A solução potencial para esse problema é a produção de antígenos recombinantes em organismos tais como a *E. coli* (Imaz et al. 2008).

Nos dias atuais, diversos testes apostaram no uso de antígenos semi-purificados. No entanto, pelo fato desses antígenos conterem epítomos capazes de fazer reação cruzada, eles produzem reações de baixa especificidade. Portanto vários autores reportaram que o uso de antígenos purificados, resolve parcialmente esse problema, por obter especificidade mais alta, apesar de reduzir a sensibilidade de cada teste sorológico (Bothamley 1995; Lyashchenko et al. 2000). Para comprovar essas conclusões, Imaz et al. (2008) pesquisaram a IgG do soro específica para três antígenos recombinantes, de 38 KDa, Hsp-X, de Ag85B separadamente e combinados, de 161 pacientes TB, sendo 51 com TB extrapulmonar, e desses 28 com TBP, juntamente com 214 controles, dos quais 14 tinham micose, 14 micobacteriosis, 4 hanseníase, 82 outras doenças e 100 controles saudáveis. A sensibilidade do ensaio com os antígenos separados variou de 25 a 42% e a especificidade de 93 a 96%. Imaz e seus colaboradores (2008) observaram que os níveis de anticorpos específicos variam muito de indivíduo para indivíduo e concluíram que embora

nenhum antígeno fosse reativo com a maioria dos soros dos pacientes com TB e, mesmo após a união dos mesmos, ou seja, complexados em um mesmo poço de ELISA, foram capazes de identificar 70% dos pacientes TB cultura positiva. Adicionalmente, Imaz e seus colaboradores (2008) ressaltam que essa perda de reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos está ligada a dois fatores: possibilidade de formação e circulação de imunocomplexos que não são detectados por ELISA e variação de pessoa para pessoa no reconhecimento antigênico.

A heterogeneidade no reconhecimento antigênico pelos anticorpos presentes no soro de pacientes com TB explica as falhas na detecção de anticorpos específicos em pacientes com TB quando apenas alguns antígenos purificados de *M. tuberculosis* são usados (Ivanyi et al. 1988) ou quando somente um antígeno micobacteriano é usado, como no presente estudo .

Significantes variações em resultados sorológicos também podem ser observadas quando usando o mesmo antígeno em amostras de soros de diferentes populações humanas. A diversidade da resposta dos anticorpos frente *M. tuberculosis* pode ser conferida aos diferentes tipos de antígenos leucocitário humano (HLA) (Agrewala & Wilkinson et al. 1999; Okuda et al. 2004). Huygen et al. (1990), usando camundongos vacinados com BCG, desvendaram que diferentes partes dos anticorpos podem se ligar a vários antígenos de *M. tuberculosis*, revelado por análise imunoblot. Assim, os anticorpos podem fazer reações cruzadas. Em humanos, a associação entre os títulos de anticorpos contra epítopos particulares de *M. tuberculosis* e certos HLA justificam também esses resultados (Bothamley et al. 1989).

O Brasil é um país multicultural que por anos recebeu imigrantes de todas as partes do mundo, em especial da África, Itália, Japão, Holanda, Portugal e outros, nesse contexto o Rio de Janeiro está estrategicamente localizado e por isso teve uma participação apreciável no acolhimento desses estrangeiros e devido a isso possui uma população muito heterogênea. Para comprovar esse fato, Weldingh e seus colaboradores, em 2005, notaram uma ampla variação na sensibilidade dos testes sorológicos quando testaram o mesmo antígeno em amostras de soro de pacientes com TB moradores de Denmark (EUA) comparados com os moradores de Uganda (África). Para o antígeno usado nesse estudo, Hsp-X, esse estudo já foi realizado e os resultados levaram os autores às mesmas conclusões (Imaz et al. 2004; Senol et al. 2007).

Portanto restrições genéticas da resposta imune ao *M. tuberculosis* e ou diferentes características entre as cepas micobacterianas prevalecem em regiões distintas do mundo, o que conseqüentemente leva à indução de diferentes respostas do hospedeiro e conseqüentemente torna compreensíveis essas variações.

A resposta imunológica humoral ao antígeno Hsp-X foi avaliada em seres humanos com TBP e outras doenças que causam derrame pleural. O ensaio imunoenzimático realizado nesses indivíduos reproduziu uma situação na qual foi possível a detecção de infecção prévia pelo *M. tuberculosis* e a conseqüente resposta imunológica deste contra o antígeno proteico recombinante Hsp-X.

As perspectivas lançadas por esses resultados implicam a avaliação do

potencial diagnóstico da proteína recombinante Hsp-X a partir de amostras obtidas de um número maior de pacientes. Dadas as possibilidades, faz-se necessária a pesquisa em grupos de estudos bem caracterizados compostos por indivíduos saudáveis de áreas endêmicas e não endêmicas, pacientes imunocomprometidos, pacientes acometidos por outras micobactérias e pacientes acometidos por outras doenças pulmonares. O emprego de dois ou mais antígenos, combinados com o Hsp-X, pode melhorar os resultados dos ensaios, conforme Daniel e Debanne (1987) e Conde (2003), o uso de mais de um antígeno é capaz de aumentar a sensibilidade em até 20% comparada com o uso de antígenos de forma isolada. Portanto a pesquisa de outros antígenos imunogênicos que poderiam combinar-se com o Hsp-X contribuiria para melhorar a eficácia do ensaio em pacientes com TBP e conseqüentemente obter um método de diagnóstico seguro, rápido, eficaz e acessível a todas as unidades de saúde do Brasil, em especial em locais em que a miséria e a pobreza dificultem o acesso desses doentes à saúde.

VII. Conclusões

- 1- O ensaio imunoenzimático, ELISA, apresentou uma boa eficácia para distinguir pacientes com TBP de pacientes com outras doenças que causaram derrame pleural. O ELISA com o antígeno rHsp-X é mais eficaz para a detecção de anticorpos IgA do LP que para anticorpos IgM do soro ou LP, ou ainda anticorpos IgG do soro ou LP.
- 2- O ELISA realizado com amostras de soro não identificou anticorpos IgM anti- Hsp-X em pacientes TBP e NTBP. O ensaio LP teve uma sensibilidade de 42% e especificidade de 83%.
- 3- O ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti Hsp-X do soro teve sensibilidade de 13% e especificidade de 83%, para pesquisa de IgG anti-Hsp-X do LP sensibilidade de 16% para a mesma especificidade de 83%.
- 4- O ELISA para pesquisa de anticorpos IgA do soro teve sensibilidade de 39% e especificidade de 83%, para pesquisa de IgA do LP sensibilidade de 65% para a mesma especificidade de 83%.

Esse estudo demonstra que análise da resposta humoral pode ajudar na identificação de novos antígenos imunodominantes como Hsp-X, para serem usados no diagnóstico de doenças extrapulmonares e

contribuir, em grande parte, para o desenvolvimento de novas vacinas de subunidade para TB.

VIII - Referências Bibliográficas¹

Abbas AK, Lichtman AH 2005. *Imunologia Celular e Molecular*, Rio de Janeiro: Elsevier, 5ª Edição.

Abebe F, Bjune G 2009. The protective role of antibody response during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin and Exper Immunol* 157: 235-243.

Agrewala JN & Wilkinson RJ 1999. Influence of HLA on the phenotype of CD4T lymphocytes specific for an epitope of the 16 kDa α crystallin antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 29: 1753-1761.

Almeida CMC, Vasconcelos-Junior AC, Kipnis A, Andrade AI Junqueira-Kipnis AP 2008. Humoral immune response of tuberculosis patients in Brazil indicate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. *Clin and Vaccine Immunol* 15: 579-81.

American Thoracic Society 2000. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 221-S247.

Anie Y, Sumi S, Varghese P, Latha Gk, Madhavi, Mundayoor Sathish, Radhakrishnan VV 2007. Diagnostic approaches in patients with tuberculous pleural effusion. *Mycobacteriol* 59: 389-394.

Antony VB, Sahan AS, Antony AC, Repine JE 1985. Bacillus Calmette-Guérin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural space in vitro. *J Clin Invest* 76: 1514-1521.

Antony VB, Hott JW, Kunkel SI, Godbey SW, Burdick MD, Strieter RM 1995. Pleural mesothelial cell expression of c-c (monocyte chemotactic peptide) and C-X-C (interleukin-8) chemokines. *Am J Resp Cell Mol Biol* 12: 581-588.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprea Aranaz, 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1785-9.

Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Larrea CF, Rivas-Santiago B 2008. Respuesta inmunitaria em tuberculosis y El papel de los antígenos de secreción de Mycobacterium tuberculosis em La protección patología y diagnóstico. *Revisión Invest Clin* 49(3): 411-441.

Arciniegas W, Orjuela DI 2006. Extrapulmonary tuberculosis: a review of 102 cases in Pereira, Colombia. *Biomedica* 26:71-80.

Avrameas S, Ternynck J, L Guesdon 1979. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scandinav J of Immunol* 8:7.

Balabanian K, Foussat A, Bouchet-Delbos L 2002. Inteleukin 10 modulates the sensitivity of peritoneal B lymphocytes to chemokines with opposite effects on

stromal cell-derived factor-1 and B-lymphocyte chemoattractant. *Blood* 99: 427-36.

Banchuin N, Wongurajana S, Pumprueg U, Jearanaisilavong J 1990. Value of an ELISA for mycobacterial antigen detection as a routine diagnostic test of pulmonary tuberculosis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 8:5-11

Barbosa T, Arruda S, Chalhoub M, Oliveira F, Melo Jr JF, Fidelis R, Neto NA, Barbosa AA, Barral-Neto 2006. Correlation between interleukin-10 and in situ necrosis and fibrosis suggests a role for interleukin -10 in the resolution of the granulomatous response of tuberculous pleurisy patients. *Microbes and Infection* 8: 889-897.

Barnes PF, Fong SJ, Brennan PI, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RI 1990. Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleurisy. *J Immunol* 145: 149-154.

Barrera L, De Kantoe IN 1987. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop Geogr Med* 39: 222-7.

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

Betts JC, PT Lukey, LC Robb, RA Mcadam, K Duncan 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression. *Mol. Microbiol* 43: 717-731.

Bezuidenhout J, Roberts T, Muller L, Helden P, Walzl G 2009. Pleural tuberculosis in patients with early HIV infection is associated with increased TNF-alpha expression and necrosis in granulomas. *PLoS ONE* 4(1): 4228.

Boletim Funasa. 2006. Tuberculose www.funasa.gov.br acessado em 29-10-2008 00:00.

Boletim Informativo Do Programa De Controle Da Tuberculose Do Município Do Rio De Janeiro – SMS 2004.

Bombarda S, Figueiredo CM, Funari MBG, Soares Junior J, Seiscento M, Terra Filho M 2001. Imagem em tuberculose pulmonar. *J Pneumol* 27(6): 329-40.

Bothamley, GH, JS Beck, GMT Schreuder, J D'amaro, RRP De Vries, T Kardjito, J Ivanyi 1989. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis* 159: 549-555.

Bothamley GH 1995. Sorological diagnosis of tuberculosis. *Eur Resp J* 20: 676s-688s.

Brodie D And Schluger NW 2005. The diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med* 26: 247-71.

Budak F, Uzaslan EK, Cangur S, Goral G, Oral HB 2008. Increased pleural soluble fas ligant (sfasL) levels in tuberculosis pleurisy and its relation with T-helper type 1 cytokines. *Lung* 186 (5): 337-43.

Caccamo, NS milano, C di sano, D Cigna, J Ivanyi, AM krensky, F Dieli, Salerno 2002 Identification of epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 16 KDa protein recognized by human leukocyte antigen A*0201 CD8+T lymphocytes. *J Infect Fis* 186: 991-998.

Campos ML, Cipriano ZM, Stamm AM de F, Tratsk KS 2000. Tuberculose. *Rev Bras Med* 57(6): 505.

Capellozi VL 2000. Tuberculose. In: Brasileiro-Filho G Bogliolo Patogenia. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 320-2.

Ceyhan BB, Demiralp E, Karakurt ZL, Karakurt S, Sungur M 2003. Transforming growth factor beta 1 level in pleural effusion. *Respirology* 8: 321-5.

Chamimowics F 2001. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil *Rev Saúde Pública* 35(1): 81-7.

Chang Z, Choudary A, Lathiagra R, Quioco FA 1994. The immunodominant 38 KDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* 269: 1956-1958.

Chiang IH, Suo J, Bai KJ 1997. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 906-911.

Conde MB E Kritski 1995. Derrame pleural exsudativo linfocitário: estudo de 462 casos. Rio de Janeiro *J Pneumol* 21(2): 67-72

Conde MB, Loivos AC, Rezende VM, Soares SI, Mello FC, Reingold AL 2003. Yield of sputum induction in the diagnosis of pleural tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(5): 676-7.

Conde MB, Suffys P, Lapa JR, Kritski AL, Dorman SE 2004. Immunoglobulin A (IgA) and IgG immune responses against P-90 antigen for diagnosis of pulmonary tuberculosis and screening for *Mycobacterium tuberculosis*. Rio de Janeiro *Clinical and Diag Laborat Immunol* 94-97.

Cooper AM, Khader SA 2008. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Reviews* 226: 191-204.

Cousins D, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S 2003. A tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* SP. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1305-14.

Crevel RV, Ottenhoff, Ven Der Meer JWM 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiol* 294-309.

Cruz A, Hhader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG 2006. CE: INF- γ Regulates the induction and expansion of IL17 producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol* 19: 409-417.

Cugell DW, Kamp DW 2004. Asbestos and the pleural: a review. *Chest* 125:1103-17.

Daniel TM & Debanne SM 1987. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial disease by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 135: 1137-51.

Das SD, Subramanian D, Prabha C 2004. Cell proliferation and apoptosis dual-signal hypothesis tested in tuberculous pleuritis using mycobacterial antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41: 85-92.

Delogu G, Sanguinetti M, Pusceddu C, Bua A, Brennan MI, Zanetti S, Fadda G 2006. PE PGRS proteins are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in host tissues. *Microbes Infect* 8(8): 2061-7.

Demissie A, EM Leyten, M Abebe, I Wassie, A Aseffa, G Abate, H A Fletcher, P Owiafe, PC Hill, R brookes, G Rook, A Zumla, SM Arend, MR Klein, TH Ottenhoff, P Andersen, TM Doherty, The Vassel Study Group 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 13: 179-186.

Demkow U, Ziokowski J, Filewska M 2004. Diagnostic value of different serological test for tuberculosis in Poland. *J Physiol Pharmacol* 55: Suppl. 3,57-66.

Dlugovitzky D, Rateni L, Torres- Morales A, Ruiz-Silva J, Pinesky R, Canosa B, Molteni O, Bottaso O 1997. Levels of interleukin-8 in tuberculous pleurisy and the profile of immuno-competent cells in pleural and peripheral compartments. *Immunol Lett* 55: 35-39.

Dominguez J, Souza-Galvão M, Ruiz-Manzano J, Latorre I, Prat C, Lacoma A, Milá C, Jiménez MA, Blanco S, Maldonado J, Altet N, Ausina V 2009. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active tuberculosis patients at the beginning, during, and after antituberculosis treatment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 63: 43-51.

Donath J 1997. From magic mountains to modern times. A view from the community hospital. *Chest* 111 (5): 1153-5.

Doyler JJ, Hnatiuk OW, Torrington KG, Slade AR, Howard RS 1996. Necessity of routine chest roentgenography after thoracentesis. *Ann Intern Med* 124 (9): 816-20.

Engval E, Perlmann P 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III: quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109: 129-35.

Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A, Schweyer S, Hermes J 2000. Apoptosis of macrophages and t cell in tuberculosis associated caseous necrosis. *J. Pathol* 191: 417-425.

Fairbairn IP 2004. Macrophage apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. *Biochem Soc Trans* 32: 496-498.

Fenton MJ, Golenbock DT 1998. LPS-binding protein and receptors. *J. Leukoc. Biol* 64: 25-32.

Ferrer SJ 1996. Pleural tuberculosis: incidence, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Pulm Med* 2(4): 327-31.

Ferrer SJ 1997. Pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 10(4): 942-7.

Fisher MA, BB Plikaytis, TM Shinnick 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosome. *J. Bacteriol* 184:4025-4032.

Fiuza FAM 1997. Atividade da adenosina desaminase (ADA) isolada e combinada a outras variáveis no diagnóstico da tuberculose pleural e sua aplicabilidade em infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) [Doutorado em Medicina]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo

Fletcher HA 2007. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med* 7:319-325.

Flynn JL & Chan J 2001. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun* 69(7): 4195-201.

Florido M, Cooper AM, Appelberg R 2002. Immunological basis of the development of necrotic lesions following *Mycobacterium avium* infection. *Immunol* 106: 590-601.

Follador ECR, Pimentel M, Barbas CSV, Takagaki TY, Kairalla RA, Deheinzelin D, Barbas Filho JV 1991. Derrame pleural tuberculoso: avaliação clínica e laboratorial. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 46 (4): 176-9.

Fontes Baganha M, Pego A, Lima MA, Gaspar EV, Pharm B, Robalo Cordeiro A 1990. Serum and pleural adenosine deaminase: correlation with lymphocytic populations. *Chest* 97: 605-610.

Foussat A, Balabanian K, Amara A 2001. Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. *Eur J Immunol* 31: 350-9.

Giusti G 1974. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU Ed. Methods of enzymatic analysis. *Academic Press, New York, NY* 1092-9.

Gounder C, De Queiroz Mello FC, Conde MB, Bishai WR, Kritski AL, Chaisson RE, Dorman SE 2002. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 40: 1989-1993.

Gupta S, Shende N, Bhatia AS, Kumar S, Harinath BC 2005. IgG subclasses antibody response to mycobacterial serine protease at different stages of pulmonary tuberculosis. *Med Sci Monit* 11: CR 3704-3709.

Haas DW, Prez, RMD 1995. *Mycobacterium tuberculosis*. Principle and Practice of Infectious Diseases, *Churchill Livingstone, New York*, 2213-2250.

Hans L Rieder 2001. Bases epidemiológicas do controle da tuberculose. Direção geral de saúde, 1º edição.

Harries AD, Hargreaves NO, Kemp J, Jindani A, Enarson DA, Maher D, 2001. Death from tuberculosis in sub Saharan African countries with a high prevalence of HIV. *Lancet* 357:1519-23.

Hino P, Costa-Hunior ML, Sasaki CM, Oliveira MF, Villa TCS, Santos CB 2007. Série histórica da mortalidade por tuberculose no Brasil (1980-2001) *Rev Latino AM Enfermagem* 15(5).

Hua CC, Chang LC, Chen YC, Chang SC 1999. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusion. *Chest* 116: 1292-1296.

Huygen K, L Ljungqvist, RT Berg, JPV Vooren 1990. Repertoire of antibody to culture filtrate antigens in different mouse strains infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 58: 2192-2197.

Imaz MS, Comini MA, Zerbini E, Sequeira MD, Latini O, Claus JD, Singh M 2004. Evaluation of commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of tuberculosis in Argentinean population. *J Clin Microbiol* 42 (2): 884-7.

Imaz MS, Schmelling MF, Kaempfer S, Spallek R, Singh M 2008. Serodiagnosis of tuberculosis; specific detection of free and complexed antibody anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens. *Bras J Infect Dis* 12 (3): 234-44.

Ivanyi J, Bothamley GH, Jackett PS 1988. Immunodiagnostic assay for tuberculosis and leprosy. *Br Med Bull* 44: 635-649.

Igiestseme JU, Eko FO, HE Q, Black CM 2003. Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intra-cellular immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* 3: 23-34.

Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M 1994. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibody delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* 179: 305-10

Kaisemann MC, Kritski AF, Pereira MFC, Trajman A 2004. Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. *J Bras Pneumol* 30(6): 549-56.

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 65: 298-304.

Koneman W 1992. En: Med Panamer Eds. Diagnóstico microbiológico de mycobactérias, P 62.

Kritski AL, Conde MB, Souza GRM 2000. Exames complementares utilizados no diagnóstico da tuberculose. In: Tuberculose. Do ambulatório à enfermaria. São Paul, Brasil: Ed. Atheneu, 2 Ed. P.54.

Krenke R, A Safianowska, M Paplinska, J Nasilowski, B Dmowska-Sobstyl, E Bogacka-Zatorska, A Jaworski, R Chazan 2008. Pleural fluid adenosine deaminase and interferon- gamma as diagnostic tools in tuberculous pleurisy. *J Physiol and Pharmacol* 59 (6):349-360.

Kunter E, Cerrahoglu K, Ilvan A, Isitmangil, Turken O, Okutan O, Kartaloglu, Cavuslu S 2003. The value of pleural fluid anti- A 60 IgM in BCG- vaccinated tuberculous pleurisy patients. *Clin Microbiol Infect* 9: 212-220.

Kurasawa T, Shimokata K 1991. Co-operation between accessory cells and T- lymphocytes in patients with tuberculous pleurisy. *Chest* 100: 1046-1052.

Jackett PS, Bothamley GH, Batra H V, Mistry A, Young DB 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 26:2313-2318.

Johnston RF, Wildrick KH 1974. The impact of chemotherapy on the care of patients with tuberculosis. *Amer Rev Resp Dis* 110: 685.

Laal S & YA Skeily 2005. Immune-based methods, p. 71-83. In S. T. Cole(ed), Tuberculosis and the tubercle bacillus. ASM Press, Washington, DC.

Lee, BY, SA Hefta, PJ Brennan 1992. Characterization of the major membrane protein of virulent Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 60: 2066-2074.

Lee YC, Rogers JT, Rodriguez RM, Miller KD, Light RW 2001. Adenosine deaminase levels in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. *Chest*, 2001; 120(2): 356-61. Comment in: *Chest*. 2001; 120(2): 334-6. *Chest*. 2002; 121(4): 1379-80.

Light RW 1995. Clinical manifestations and useful tests In: Pleural diseases. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 36-74.

Light RW 1995. Pleural Diseases. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger.

Light RW 1999. Useful test on the pleural fluid in the management of patient with pleural effusion. *Curr Opin Pulm Med* 5: 245-52.

Light RW 2006. The undiagnosed pleural effusion. *Clinics in chest medicine* 27: 309-319.

Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML 2000. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious disease. *J Immunol Methods* 242: 914-100.

Lopes A J, Capone D, Mogami R, Tessarolo B, Cunha DL, Capone RB, Siqueira HR, Jasen JM 2006. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão RJ* 15(4): 253-261.

Maeba J, Ueki N, Ohkawa T, Iwahashi N, Nakano T, Hada T, Higashino K 1993. Local production and localization of transforming growth factor-beta in tuberculous pleurisy, *Clin Exp. Immunol* 92: 32-38.

Maglione PJ, Chan J 2009. How b cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. *Eu j Immunol* 39: 676-686.

Martins SAS, Gerhardt Filho G, Santiago AC, Peyneau AR, Paiva HC, Guimarães CA, Dettoni VV 1977. Derrame pleural tuberculoso. *Tisio-Pneu* IX(1): 133-66.

Merino MC, Adriana G 2006. Origen y desarrollo de linfocitos B1 una población celular involucrada em defensa y autoinmunidad. *Medicina, Buenos Aires* 66: 165-172.

MCMurray DN 2001. Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med* 7 (3): 135-7.

Ministério Da Saúde 2005. acessado em 24/07/2009 12:40h.
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/d0202.pdf>

Ministério Da Saúde (BR) 2002. Controle da tuberculose: uma resposta de integração ensino-serviço, Rio de Janeiro (RJ): Ministério da saúde.

Ministério Da Saúde 2007. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação Rio de Janeiro, 3º edição.

Miserocchi G 1997. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Resp J* 10: 219-225.

Mucida D, Bilate A, Basso A 2008. Células T reguladoras: desenvolvimento tímico e periférico. *Immuno Rib*, número 72, ano VII.

Murate T, Mizoghuchi K, Amaro 1990. Antipurified-protein-derivative antibody in tuberculosis pleural effusion. *Chest* 97: 670-673.

Murray JF & Nabel JA 1994. Textbook of respiratory Medicine, 2º Edition.

Natal S, Valente JG, Sanches AR, Penna MLF 2003. Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. *Cad Saúde Pública* 19 (5): 1277-81.

Neves DD 1992 Diagnóstico diferencial dos exsudatos. In: Chibantes MAS Doenças da pleura 1 ed Rio de Janeiro: Revinter, 76-90.

Neves DD 1992. O valor da adenosina deaminase no diagnóstico diferencial dos derrames pleurais [Tese de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal DO Rio de Janeiro.

Neves DD, Dias RM, Cunha Ajla, Chibante MAS 2004. Rendimento de variáveis clínicas, radiológicas, e laboratoriais para o diagnóstico da tuberculose pleural *J Bras Pneumol* 30(4) 409-16.

Nisitani S, Tsubata T, Murakami M, Honjo T 1995. Administration of interleukin 5 or 10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte autoantibody-transgenic mice. *Eur J Immunol* 25: 3047-52.

Ogawa K, Koga H, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S 1997. Differential diagnosis of tuberculous pleurisy by measurement of cytokine concentration in pleural effusion. *Tuber Lung Dis* 78: 29-34.

Okuda Y, Maekura R, Hirotsu A 2004. Rapid serodiagnosis of active pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by analysis of results from multiple antigen-specific tests. *J Clin Microbiol* 42: 1136-1141.

Olival L 2008. Diagnóstico de tuberculose pleural utilizando a técnica imunoenzimática no soro e no líquido pleural. Dissertação de mestrado em medicina. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Orme I 2004. Adaptive immunity to mycobacteria. ***Curr Opin Microbiol* 7(1):58-61.**

Prabhac, Jalapathy KV, Matasa RP, Das SD 2007. Differential T helper cell response in tuberculous pleuritis. *Indian J. Med Microbiol* 25: 18-23.

Prabha C, Rajashree P, Sulochana D Das 2008. TLR2 and TLR 4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid. *Immunol Letters* 117: 26-34.

Promikiamon B 1997. Comparison of various diagnostic test in tuberculous pleuritis. *Thorac Societ of Thailand Newalet* 6:5.

Rabahi MF, Junqueira-Kipnis AP, Reis MCG, Oelemann W, Conde MB 2007. Humoral response to Hsp-X and Glc-B to previous and recent infection by *M. tuberculosis*. *BMC Infectious Diseases* 7:148.

Raja A, KR Uma Devi, B. Ramalingam, PJ Brennan 2002. Immunoglobulin G, A and M response in serum and circulating immune elicited by the 16 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn. Lab. Immunol* 9: 308-312.

Raja A 2004. Immunology of tuberculosis *Indian J Med Res* 120, October , p. 231-2332.

Raja A, Ranganathan UD, Ramalingam B 2006. Clinical value of specific detection of immune complex-bound antibody in pulmonary tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56(3): 281-7.

Rees AD, Roman E, Moreno C 1993. The effect of lipoylation on human epitope specific CD4 T-cell recognition of the 19 KDa mycobacterial antigen. *Immunol* 80: 407-414.

Reljic R, Ivanyi J 2006. A case for passive immunoprophylaxis against tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 6: 813-18.

Riantawan P, Chaowalit P, Wongsangiem M, Rojanarawe E Wong 1999. Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase in tuberculous pleuritis with reference to HIV coinfection and Bayesian analysis. *Chest* 116(1): 97-103.

Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z 2005. The cellular immune response in pulmonary tuberculosis. *Invest Clin* 46 (4): 391-412.

Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H 2002. TNF regulates chemokine induction essential for the cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-4627.

Rojas EO, Cabrera CR 2000. Desarrollo de inmunógenos y vacunas contra lepra y tuberculosis. *Vacunas* 249-260.

Rose N 1997. Manual of clinical laboratory in immunology. Cytokines and immune cells products. *Nombre Revista* 5: 536

Rosenkrands I, RA Slayden, J Crawford, C Aagard , CE Barryiii, P Andersen 2002. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteasome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Bacteriol* 184: 3485-3491.

Rossette ML 2006. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev Saúde Pública* 36(4): 525-32.

Rossi GA, Balbi B, Manca F 1987. Tuberculous pleural effusions: evidence for a selective presence of PPD-specific T-lymphocytes at the site of inflammation in the early phase of the infection. *Am Rev Resp Dis* 136: 575-579

Sable SB, Verma I, Jhuller GK 2005. Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 23: 4175-4184.

Sahn SA 1988. The pleura. State of art. *Am Rev of Respir Dis* 138: 184.

Samanich K, Belisle JT, Laal S 2001. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun* 69 (7): 4600-9.

Sasse SA, Jadus MR, Kukes GD 2003. Pleural fluid transforming growth factor-beta 1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. *Am J Resp Crit Care Med* 168: 700-5.

Schluger NW 2001. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. ***Am J Respir Crit Care Med* 164(11): 2020-4.**

Seibert AF, Haynes JR J, Middleton R, Bas JB 1991. Tuberculous pleural effusion - twenty-year experience. *Chest* 99: 883-6.

Seiscento M, Bombarda S 2004. Tuberculose pleural In: Vargas FS, Teixeira Ir, Marchi E. Derrame pleural. *São Paulo: Roca* 272-84.

Seiscento M, Conde MB, Dalcolmo MMP 2006. Tuberculose pleural *J Bras Pneumol* 32 (4): s174-s 181.

Seiscento M, Vargas F S, Antonangelo L, Acencio MMP, Bombarda S, Capelozzi VL, Teixeira LR 2007. Transforming grow factor $-\beta$ 1 as a predictor of fibrosis in tuberculous pleurisy. *Respirol* 12: 660-663.

Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskun M, Gunduz AT, Biçmen C, Ertas M, Ozkan SA 2007. Humoral immune response against 38 KDa and 16 KDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Resp J* 29 (1): 143-8.

Sherman DR, M Voskuil, D Schnappinger, R Liao, M I Harrel, GK Schoolnil 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7534-7539.

Siawaya JFD, Chegou NN, Van Den Heuvel MM, Diacon AH, Beyers N, Van Helden P, Walzl 2009. Differential cytokine/ chemokines and KL-6 profile in patients with different forms of tuberculosis. *Cytokine* Jun.

Silva JR CT 2000. Adenosina desaminase “versus” histopatológico pleural: a avaliação da importância da toracocentese isolada para o diagnóstico da tuberculose pleural [Tese de doutorado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense.

Silva VMC, G Kanaujia, ML Gennaro, D Menzies 2003. Factores associated with humoral response to ESAT-6, 38 KDa and 14 KDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 7 (5): 478-484.

Singh KK, Zhang X, Patibandla AS, Chien P, JR, Laal S 2001. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. *Infect Immun* 69 (6): 4185-91.

Sing KK, Dong Y, Belisle JT, Harder J, Arora VK, Laal S 2003. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* recognize by antibodies during incipient, subclinical tuberculosis. *Clinical and Diagn Labor Immunol* 2: 354-358.

Soares ECC 2002. Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN): Informações sobre as notificações de tuberculose obtidas na SMS-RJ. In. Rio de Janeiro: Secretaria Municipal de Saúde.

Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell, Ramsay A, Menzies R, Cunningham J, Weldingh K, Pai M 2007. A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Thorax* 3 Aug.

Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell PC, Ramsay A, Pai M, Laal S 2009. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin and Vaccine Immunol* 260-276.

Talaat AM, Lyons R, Howard ST, Johnston SA 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (13): 4602-7.

Tarantino AB 2002. Doenças pulmonares- 5º edição Guanabara Koogan: 1067.

Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xuj, Tanaka K, Koch C, Tufariello J 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murino and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol* 8: 218-232.

Valdes L, San-Jose E, Alvarez D, Sarandeses A, Pose A, Chomon B, Alvarez-Dobano-JM, Salgueiro M, Rodriguez-Suarez SO 1993. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon gamma. *Chest* 103(2):458-65.

Valdes L, Alvarez D, San Jose E, Penela P, Valle JM, Garcia-Pazos JM, 1998. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 158(18): 2017-21.

Valdes L, Pose A, San Jose E, Martinez Vazquez JM 2003. Tuberculous pleural effusion. *Eur J Intern Med* 14(2):77-88.

Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF 2000. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis* 182: 234-239.

Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canettii*: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47(4): 1236-45.

Verbon A, Hartskeerl RA, Schuitema A, Kolk AH, Young DB, Lathigra R 1992. The 14,000-molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low –molecular-weight heat shock proteins. *J Vacteriol* 174: 1352-1359.

Villena V, López Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Alvarez Martinez, C, Martin Escribanoc P 2002. Estudio prospectivo de 1.000 consecutivos pacientes con derrame pleural. Etiología del derrame y características de los pacientes. *Arch Bronconeumol* 38: 21-6.

Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, Schoolnik GK 2003. Inhibition of respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. *The J of Experim Med*.

Xue-jun q., Huan-zhong s, Giu-li L, Lu-Ying H, Hai-Bo Y 2008. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in tuberculous pleural effusion. *Chin Medical J* 121(7): 581-586.

Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu YM, Weng HH, Wang HH 2005. Antibody response to four secretory

Wallis RS, Ellner JJ 1994. Cytokines and tuberculosis *J Leukoc Biol* 55: 676-681.

Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P 2005. Assessing the serodiagnostic potential of 35 Mycobacterium tuberculosis proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol* 43: 57-65.

WHO, World Health Organization 1997. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/ IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 1994-1997. *World Health Organization Global Tuberculosis Programme, Geneva* p. 229.

WHO, World Health Organization 1997. Tuberculosis diagnostics: product development guidelines. Workshop report (Online) 1 -27. Geneva, Switzerland: World Health Organization www.who.int/tdr/publications.

WHO, World Health Organization 2006. Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. Publication WHO/HTM/TB. *WHO*. Vol.362.

WHO, World Health Organization 2008. Acesso em agosto de 2008. 22:45 www.who/cds/tb/2008.

WHO, World Health Organization 2009. Global tuberculosis Control 2009. *Epidemiol Strategy and Finan*.

WHO, World Health Organization 2009 Acesso em junho de 2009, 19:06 http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/bra.pdf.

Wiker HG, Harboe M 1992. The antigens 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Res* 56: 648-661.

Wisdraw O, Nilsson BS 1982. Pleurisy induced by intrapleural BCG in immunized guinea-pigs. *Eur J Resp Dis* 63: 425-434.

Wong, PC, 2005. Management of tuberculous pleuritis: can we do better? *Respirol* 10(2): 144-8.

Yamanda Y, Nakamura A, Hosoda M, kato T, Asano T, Tonegawa K, Itoh M 2001. Cytokine in pleural liquid for diagnosis of tuberculous pleurisy. *Resp Med* 95: 577-581.

Yan B 1998. Chemotherapy of tuberculosis: current status and prospects. ***Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 21(7): 387.**

Yates MD, Grange JM 1988 Incidence and nature o human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South-East England: 1977-1987. *Epidemiol Infect* 101: 225-9.

Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, LU S, Modlin RL, Barnes PF 1994.

Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 93: 1733-1739.