

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

BRUNA DANIELLA DE SOUZA SILVA

Participação das células Th1, Th17 e T reguladoras no desenvolvimento da
tuberculose ativa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis
Co-orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Dissertação de Mestrado

Goiânia – GO, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA**

BRUNA DANIELLA DE SOUZA SILVA

Participação das células Th1, Th17 e T reguladoras no desenvolvimento da
tuberculose ativa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis
Co-orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública na área de concentração de Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do CNPq Universal, processo n.479605/2007-6 e do Projeto Casadinho (CNPq), processo n. 620052/2008-2.

Goiânia – GO, 2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPI/BC/UFG**

S586p
Silva, Bruna Daniella de Souza.
Participação das células Th1, Th17 e T reguladoras no desenvolvimento da tuberculose ativa [manuscrito] / Bruna Daniella de Souza Silva. – 2010.
129 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof. Dr^a. Ana Paula Joaquim Kipnis; Co-orientador: Prof. Dr. André Kipnis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Tuberculose. 2. Resposta Imune Celular. 3. Artrite Reumatóide. I. Título.

CDU: 616.24-002.5

A meu pai: Lázaro Alves de Souza, *in memoriam*,
o maior mestre que já tive,
minha estrela guia na jornada da vida.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder mais essa importante vitória e por me dar a oportunidade de viver e conhecer pessoas maravilhosas, ter desafios e crescer como pessoa nessa vida cheia de obstáculos.

*Ao meu pai, **Lázaro Alves** (in memoriam), a pessoa mais maravilhosa desse mundo que me ensinou a viver e a ser forte, me dando a maior herança de todas: a educação. Foi o meu exemplo de vida, amor, paciência, sabedoria, honestidade, carisma, felicidade, aprendizagem, coragem, determinação e perseverança. Contribuiu totalmente para as minhas vitórias e para a minha formação. Onde você estiver pai, muito obrigada por fazer de mim a sua semente!*

À minha mãe, Maria José, atriz principal da minha peça da vida. Sem você, seria impossível alcançar essa conquista. Obrigada por me trazer ao mundo e por permitir que eu chegasse até aqui. Você é a chave fundamental da minha formação e a base para a construção da minha vida. Te amo muito!

Ao meu irmão Denner e a minha cunhada Tathiana, pelo apoio e pelos conselhos dados nos momentos mais críticos da minha vida. Amo Vocês!

Ao amor da minha vida, meu noivo Elvis, pelo amor, dedicação, atenção e paciência prestados a mim durante toda a minha trajetória. Obrigada por me devolver a vontade de viver e por me fazer a mulher mais feliz desse mundo. Amo você!

À minha querida orientadora Ana Paula Junqueira Kipnis, por me proporcionar as maiores oportunidades que eu pude ter, me ensinando a ter determinação nos objetivos. Obrigada por ser minha irmã mais velha, me ouvir, dar conselhos, me ensinar tudo o que eu sei e me conceder a graça de ser sua orientanda. Você é um exemplo de superação para todos!

Ao meu co-orientador André Kipnis, pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos e por contribuir para a realização desse trabalho. Você nos motiva a sempre seguir em frente, independente do que aconteça.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas: Adeliane, Eduardo, Fernando, Juliana, Letícia, Lorena, Mayara, Monalisa, Michelle e Patrícia pelos momentos de descontração, trabalho, apoio e pelo companheirismo, por acreditarem em mim e me darem forças para continuar até aqui. Obrigada também a todos os meus colegas do Laboratório de Bacteriologia Molecular pela motivação nas explicações.

À Dra. Elisângela Ribeiro, pessoa mais que fundamental para a execução deste trabalho, sempre disposta a nos ajudar da melhor maneira possível.

A toda a minha família e a todos os meus amigos, em especial à Aline, à Ana Maria e ao Cleubmar, que mesmo longe, acreditaram em mim, me apoiando a seguir sempre o meu coração nas minhas decisões.

A todos os meus mestres, pelos ensinamentos e por serem responsáveis pela minha formação profissional. Em especial, a Mara Sílvia Carvalhaes, que além de professora, foi minha orientadora e me influenciou nesse caminho escolhido, me dando a oportunidade de conhecer outros ângulos da imunologia em seu laboratório. Obrigada!

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Patologia Geral do IPTSP, pela oportunidade de ser professora e por dividir comigo ensinamentos novos e essenciais para o meu amadurecimento profissional. Em especial à Lílíana e à Aline por permanecerem ao meu lado em momentos críticos e pelos conselhos importantes em momentos aflitos.

Agradeço às Profas. Dra. Alessandra Marques Cardoso, Dra. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola e à Dra. Aline Carvalho Batista pela disposição e pelas considerações fundamentais para incrementar esse trabalho. Em especial à Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato por contribuir diretamente para o meu desenvolvimento na área científica, pela oportunidade vivida em seu laboratório e por ser tão prestativa no aperfeiçoamento deste trabalho. Obrigada a todas!

A todos os meus colegas do IPTSP/UFG pela convivência diária que fazem do nosso ambiente de trabalho o lugar ideal para o desenvolvimento das nossas pesquisas e para o nosso crescimento.

A todos os funcionários do IPTSP/UFG, pelo sorriso diário em dias nublados, pela competência e pelas atitudes que de alguma forma contribuíram para a execução dos experimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

“Por mais frio que seja o inverno,
sempre é seguido pela primavera”.

Eddie Vedder

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura	1
1.1 Epidemiologia	2
1.2 Agente Etiológico	2
1.3 Antígenos do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.4 Patogenia da Tuberculose	5
1.5 Formação do Granuloma	6
1.6 Indução da Resposta Imune na Tuberculose	7
1.7 Mecanismos de Evasão da Micobactéria	14
2. Justificativa	16
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4. Metodologia	21
4.1 População em Estudo	22
4.2 Coleta das amostras	23
4.3 Realização do Teste de Sensibilidade à Tuberculina	23
4.4 Antígeno Protéico	23
4.5 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico e Cultura Celular	24
4.6 Análise da produção de citocinas pelas subpopulações de células T (Th1, Th17 e T reguladoras) quanto a positividade para as citocinas IFN- γ , IL-17, TGF- β e IL-10	24
4.7 Imunocitoquímica	25
4.8 Ensaio Funcional	26
4.9 Análise Estatística	27
5. Resultados	28

5.1 Perfil sócio-epidemiológico dos participantes	29
5.2 Análise das células TCD4+	29
5.3 Análise de células Th1 IFN- γ +	30
5.4 Análise de células Th17 IL-17+	35
5.5 Análise de células T reguladoras	37
5.6 Análise de células T reguladoras TGF- β +	41
5.7 Análise de células T reguladoras IL-10+	43
5.8 Análise das células de pacientes com alto risco de desenvolvimento de tuberculose ativa	45
5.9 Ensaio Funcional	47
6. Discussão	48
7. Conclusões	57
8. Referências Bibliográficas	59
9. Anexos	73
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás para pesquisa com os pacientes com tuberculose	74
Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás para pesquisa com os pacientes com artrite reumatóide	75
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos pacientes com tuberculose e aos controles saudáveis	76
Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos pacientes com artrite reumatóide	78
Anexo 5 – Questionário Sócio-epidemiológico aplicado aos pacientes com tuberculose e aos controles saudáveis	81
Anexo 6 – Questionário Sócio-epidemiológico aplicado aos pacientes com artrite reumatóide	83
Anexo 7 – Artigo científico publicado	85
Anexo 8 – Artigo Científico enviado para publicação	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
Figura 2. Pacientes com Tuberculose ativa apresentam maior número de células TCD4 ⁺ totais no sangue periférico	32
Figura 3. Exemplos de <i>Dot Plots</i> de citometria de fluxo representando a seleção de células TCD4 ⁺ T-bet ⁺ IFN- γ ⁺ .	33
Figura 4. Porcentagens de células TCD4 ⁺ T-bet ⁺ IFN- γ ⁺ específicas ao antígeno rGLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+).	34
Figura 5. Exemplos de <i>Dot Plots</i> de citometria de fluxo representando a seleção de células CD4 ⁺ IL-23R ⁺ IL-17 ⁺ .	35
Figura 6. Porcentagens de células TCD4 ⁺ IL-23R ⁺ IL-17 ⁺ específicas ao antígeno rGLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+).	36
Figura 7. Presença de células expressando marcadores de células T reguladoras no sangue periférico de pacientes com tuberculose e indivíduos saudáveis.	38
Figura 8. Exemplos de <i>Dot Plots</i> de citometria de fluxo representando a seleção de células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ .	39
Figura 9. Porcentagens de células T reguladoras (TCD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺) específicas ao antígeno rGLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+).	40
Figura 10. Porcentagens de células Treg TGF- β ⁺ (TCD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ TGF- β ⁺) específicas ao antígeno rGLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+).	42
Figura 11. Porcentagens de células Treg IL-10 ⁺ (TCD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ IL-10 ⁺) específicas ao antígeno rGLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+).	44
Figura 12. Análise das células de paciente com AR e TBAR.	46
Figura 13. Inibição da proliferação de células autólogas em pacientes com TB por células Treg.	47
Figura 14. Esquema representativo da participação das células Th1, Th17 e T reguladoras no desenvolvimento da tuberculose ativa	56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo para marcação celular	27
Tabela 1. Características clínicas, radiológicas e laboratoriais dos grupos estudados	31

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APC – Aloficocianina
BAAR – Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG – Bacillus Calmete Guérin
CD – Marcador de Diferenciação
CFP – Proteína de Filtrado de Cultura
CR – Receptor do Complemento
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ESAT-6 – Antígeno Alvo de Secreção Primária
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
FOXP-3 – Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras (Forkhead Box 3)
GLcB – Malato sintase G
HIV – Human Immunodeficiency Virus / SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IFN- γ - Interferon Gama
IL – Interleucina
kDa – Quilodalton
LAM – Lipoarabinomananas
LM – Lipomananas
MPT-51 – Proteína micobacteriana de 27kDa ou Ag85D
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
NK – Células Natural Killer
NO – Óxido Nítrico
OMS ou WHO – Organização Mundial de Saúde
PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS – Tampão de Salina Fosfato
PE – Ficoeritrina
PerCP – Proteína Peridina de Clorofila
PHA – Fito hemaglutinina
PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD – Derivado Protéico Purificado de *Mycobacterium tuberculosis*
RORc2 – Fator de Transcrição para diferenciação de células Th17 (retinoic-acid related orphan receptor C isoform 2)
TB – Tuberculose
Tc – Linfócito T citotóxico
TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th – Linfócito T auxiliar
TLR – Receptor Semelhante ao Toll
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg – Células T reguladoras
TfR – Receptor Transferrina
TST – Teste de Sensibilidade à Tuberculina

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença que atinge a humanidade de forma catastrófica, causando milhões de casos novos e de mortes no mundo todo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo da TB, *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente, os principais desafios no controle da TB são: a identificação dos indivíduos latentes, que são os principais indivíduos com potencial desenvolvimento da doença e o tratamento efetivo dos indivíduos com doença ativa. O entendimento da resposta imunológica nessa doença é de crucial importância para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e novas vacinas para combater de forma efetiva essa enfermidade. Com o intuito de elucidar a resposta imune celular envolvida no desenvolvimento da tuberculose ativa, avaliamos as subpopulações de células TCD4⁺ Th1, Th17 e T reguladoras de pacientes com tuberculose pulmonar e pacientes com artrite reumatóide ativa frente ao antígeno recombinante GLcB do *M. tuberculosis*. Foram obtidas células mononucleares do sangue periférico de vinte e um pacientes com tuberculose pulmonar ativa, recrutados no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, vinte e cinco pacientes com artrite reumatóide, onze indivíduos com tuberculose latente (PT+) e doze indivíduos saudáveis (PT-). Estas células foram cultivadas, estimuladas com o antígeno recombinante GLcB e as subpopulações Th1, Th17 e T reguladoras foram avaliadas através da análise das citocinas IFN- γ , IL-17 e TGF- β e IL-10, respectivamente, por citometria de fluxo. Constatou-se que pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentam maior resposta de células Th1 (8.2 ± 1.9), Th17 (3.9 ± 2.1) e T reguladoras (2.8 ± 1.2) específicas ao antígeno recombinante GLcB quando comparados com indivíduos com infecção latente (Th17= 2.8 ± 1.3 ; Treg= 3.1 ± 1.2), e controles saudáveis (Th17= 1.4 ± 0.8 ; Treg= 0.6 ± 0.3). Indivíduos com infecção latente apresentam somente porcentagem significativa de células Th1 (4.6 ± 1.1) específicas ao GLcB quando comparado aos controles (1.7 ± 1.0). Pacientes com AR não apresentaram diferença significativa na porcentagem destas células quanto à classificação em PT+ e PT-. Porém, pacientes com AR que desenvolveram tuberculose apresentaram resposta semelhante aos pacientes com TB. Diante destes resultados, podemos concluir que as células Th1, Th17 e T reguladoras estão diretamente envolvidas na doença ativa.

Palavras-chave: Tuberculose, Resposta Imune Celular, *Mycobacterium tuberculosis*, Antígeno recombinante GLcB.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease that afflicts mankind catastrophically, causing millions of new cases and deaths worldwide. It is estimated that one third of the world population is infected with the TB bacillus, *Mycobacterium tuberculosis*. Currently, the major challenges in TB control are the identification of latent individuals, who have increased chances to become ill, and the effective treatment of individuals with active disease. Understanding the immunology of this disease is of crucial importance for the development of new diagnostic tests and vaccines to combat this disease effectively. In order to elucidate the cellular immune response in tuberculosis, we evaluated the subpopulations of TCD4⁺ Th1, Th17 and T regulatory cells of patients with active pulmonary tuberculosis and rheumatoid arthritis against the recombinant antigen GLcB of *M. tuberculosis*. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from twenty one patients with active pulmonary tuberculosis, recruited at Anuar Auad Hospital, twenty five patients with rheumatoid arthritis (RA), eleven individuals with latent tuberculosis (TST+) and twelve healthy subjects (TST-). These cells were cultured, stimulated with antigen recombinant GLcB and Th1, Th17 and T regulatory subsets cells were evaluated by flow cytometry. It was found that patients with active pulmonary tuberculosis have a higher response of Th1 (8.2 ± 1.9), Th17 (3.9 ± 2.1) and T regulatory (2.8 ± 1.2) antigen-specific recombinant GLcB when compared with individuals with latent infection (Th17= 2.8 ± 1.3 ; Treg= 3.1 ± 1.2) and healthy controls (Th17= 1.4 ± 0.8 ; Treg= 0.6 ± 0.3). Individuals with latent infection have only a significant percentage of Th1 cells specific (4.6 ± 1.1) to GLcB when compared to controls (1.7 ± 1.0). RA Patients that developed tuberculosis had immune response similar to those with only TB. Given these results, we conclude that the Th1 cells, Th17 and regulatory T cells are directly involved in active disease.

Keywords: Tuberculosis, Cellular Immune Response, *Mycobacterium tuberculosis*, recombinant antigen GLcB.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa grave que causa aproximadamente oito milhões de novos casos e mais de dois milhões de mortes a cada ano. A estimativa é de que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada com o *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da TB (WHO 2009). Na maioria dos infectados, este patógeno persiste em latência, caracterizando doença assintomática ou infecção latente, onde as manifestações clínicas não são evidentes (Wayne 1994). Essas características dificultam o diagnóstico preciso dos indivíduos acometidos, contribuindo para uma maior disseminação da doença (Andersen 2007).

Uma das principais preocupações da Organização Mundial de Saúde (OMS) com relação à TB é a co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Estima-se que aproximadamente seis milhões de pessoas no mundo todo estão co-infectadas com *M. tuberculosis* e HIV e destes morrem cerca de 200 mil a cada ano (WHO 2009). Têm sido descrita como a principal causa de morte em indivíduos infectados com o HIV no Brasil (MS/SVS 2009; Corbett et al. 2003). Além disso, indivíduos que utilizam drogas imunossupressoras para tratamento de outras enfermidades, como por exemplo, a artrite reumatóide, podem desenvolver tuberculose ativa ao longo da vida (León et al. 2005).

O Brasil possui como um dos seus principais problemas de saúde pública a tuberculose. Ocupando o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo, nosso país possui cerca de 50 milhões de infectados com aproximadamente 85 mil casos novos notificados a cada ano (MS/SVS 2009). De acordo com a OMS, o país é endêmico para esta doença e representa um dos países da América Latina com maior índice de casos (WHO 2009).

Segundo o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) em Goiás foram registrados mais de 900 casos de TB só no ano de 2008. Goiânia e Aparecida de Goiânia são as cidades que concentram a maior parte dos casos já registrados, representando cerca de 90% dos casos em todo o estado de Goiás (MS/SVS 2009).

1.2 Agente Etiológico

O principal agente etiológico da TB humana é *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), uma bactéria aeróbica, intracelular facultativa que possui a forma de bastonetes retos e finos, e por isso, também chamados de bacilos. O Mtb é resistente ao processo de descoloração pelo álcool-ácido, sendo classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) podendo sobreviver na ausência quase total de água durante semanas (Aderem & Underhill 1999). É um bacilo que apresenta crescimento lento, se duplicando a cada 12-20h, em temperatura ideal de 34-38°C. Para o crescimento do Mtb é necessário realizar a cultura do bacilo em meio Lowenstein-Jensen (L-J) ou em meio ágar

7H10/7H11 Middlebrook e somente após 2-6 semanas de cultivo, nas condições apropriadas é possível visualizar as suas colônias (James et al. 2000; Crump et al. 2003; Adler et al. 2005). Embora existam relatos de sua existência desde 2050 a. c. em múmias do antigo Egito (Cave 1939; Daniel 2006), foi isolado pela primeira vez em 24 de março de 1882 pelo cientista alemão Heinrich Hermann Robert Koch (Kaufmann & Winau 2005).

Mtb pertence a um complexo chamado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* que é constituído de outras seis espécies e subespécies que incluem *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. caprae*. Somente as duas primeiras espécies juntamente com Mtb causam tuberculose em humanos (Roberts 1991). Os membros desse complexo possuem características comuns, como o período de crescimento lento e a pouca variação genética, levando a hipótese de que são patógenos que derivaram de um ancestral comum (Ernst et al. 2007).

A parede celular do Mtb é complexa, pois é rica em glicolipídeos, polissacarídeos, lipídeos e proteínas que estão envolvidos na ativação e na regulação da resposta imune do hospedeiro (Collins & Kaufmann 2001). A membrana plasmática é envolta por uma camada de peptidoglicano que está covalentemente ligado a arabinogalactanas esterificadas com ácidos micólicos. Além disso, há uma variedade de lipídeos livres ligados à parte externa da parede celular e uma grande quantidade de glicolipídeos [como lipoarabinomananas (LAM) e lipomananas (LM)], ancorados na membrana plasmática. Intercaladas nessa rede existe uma quantidade significativa de proteínas que podem ser permanentes ou se encontram em processo de secreção (Brennan & Nikaido 1995; Daffe & Draper 1998) (Figura 1). Algumas destas proteínas são responsáveis pela manutenção da parede celular durante toda a vida do bacilo (Rastogi & Sola 2007). Essa estrutura dá a forma característica do bacilo e confere proteção, principalmente da ação mecânica, de enzimas hidrolíticas e radicais tóxicos produzidos pelas células fagocíticas (Tiwari et al. 2004; Brennan 2003).

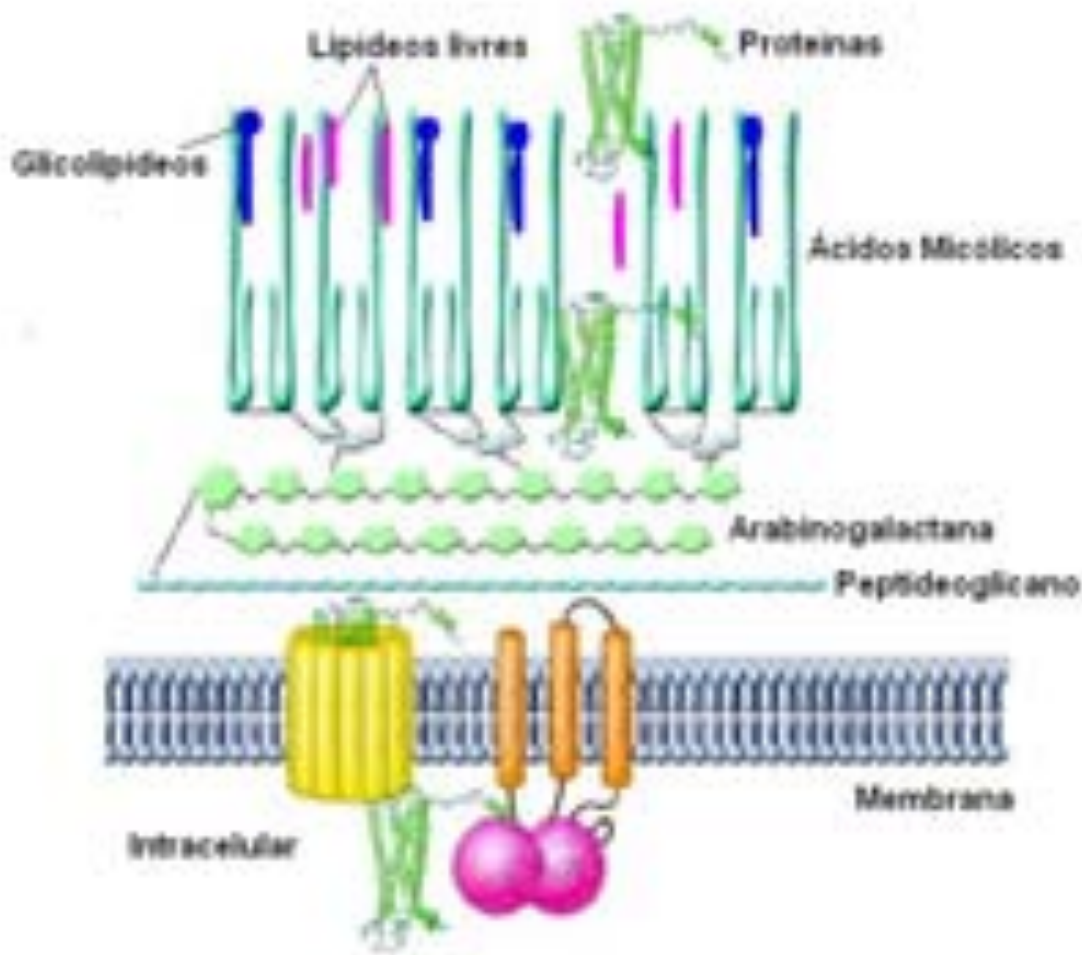


Figura 1. Esquema representativo da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado de Ernst et al. 2007.

1.3 Antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*

O Mtb produz e secreta uma série de proteínas que possuem fundamental importância na sua sobrevivência e na patogênese da TB. Muitas dessas proteínas funcionam como antígenos que estimulam as células imunológicas do hospedeiro e induzem a resposta imune contra o agente. Através da análise molecular de Mtb (H37Rv) cultivado em meio Ágar 7H11 (Middlebrook) foi possível identificar e caracterizar uma série de frações protéicas do Mtb. Aproximadamente 100 polipeptídeos já foram isolados e purificados, permitindo o estudo das propriedades de cada proteína na estimulação da resposta imune (Boesen et al. 1995; Arend et al. 2000). Várias dessas proteínas (MPT-51, ESAT-6, GLcB, Complexo Ag 85, HspX, CFP-10 dentre outras) que já foram isoladas receberam maior atenção por serem expressas em altas concentrações quando o Mtb encontra-se em condições de estresse, como por exemplo, na ausência de oxigênio, condição essa que mimetiza a presença do agente nos alvéolos pulmonares do indivíduo infectado (Geluk et al. 2000).

O GLcB (Rv1837c) é uma proteína de 81 kDa caracterizada como uma malato sintase, enzima que possui a função de produzir carboidratos a partir da α -oxidação de ácidos graxos. Está envolvida diretamente no ciclo do glioxilato, onde ela condensa o glioxilato formado a partir do isocitrato

à Acetil-CoA formando o Malato que é usado na gliconeogênese e está relacionada com a virulência do Mtb. O ciclo do glioxilato é importante para sobrevivência do Mtb em situações adversas, como pouco oxigênio, condição que inibe a multiplicação do bacilo em meio ambiente intracelular (Munoz-Elias & Mckinney 2005). Pode também funcionar alternativamente como uma proteína de adesão através da ligação com a laminina do hospedeiro (Kinhikar et al. 2006). Estudos já realizados com o GLcB mostram que ele é requerido para o crescimento e a virulência do Mtb *in vivo* (Munoz-Elias & Mckinney 2005).

O antígeno recombinante GLcB é uma proteína que funciona como um marcador da tuberculose (Achkar et al. 2006), visto que ele foi capaz de discriminar indivíduos com tuberculose ativa de controles saudáveis através do reconhecimento por anticorpos séricos da classe IgM e IgG em pacientes com TB (Almeida et al. 2008) e foi reconhecido por anticorpos em 80% de pacientes com TB HIV⁺ na Índia (Singh et al. 2005). Além disso, pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentam resposta imune específica de células TCD4⁺ e TCD8⁺ contra este antígeno, indicando o seu potencial imunogênico (Araújo-Filho et al. 2008).

1.4 Patogenia da Tuberculose

A tuberculose é uma doença contagiosa, transmissível, que compromete principalmente o pulmão, embora possa afetar outros sítios anatômicos, uma vez que o bacilo pode se propagar através das vias linfática e/ou sanguínea. A transmissão ocorre pela via respiratória através da inalação de bacilos contidos na fala, tosse ou espirro de indivíduos que apresentem a doença clinicamente ativa ou a infecção latente (Raja 2004). O estabelecimento da infecção ativa depende tanto de fatores associados ao bacilo, como a virulência da cepa infectante da micobactéria e a quantidade de bacilos viáveis que atingem o pulmão, quanto fatores associados ao hospedeiro, como a predisposição genética e o grau de ativação do sistema imunológico (Collins & Kaufmann 2001).

Durante a infecção, Mtb reside principalmente dentro de macrófagos, células que além da fagocitose exercem uma potente atividade antimicrobiana (Ardeleanu et al. 2004). Ao entrar em contato com o bacilo, 80-90% dos indivíduos desenvolvem uma resposta imune protetora levando à eliminação ou latência (Wayne 1994). Somente 5-10% dos indivíduos infectados apresentam sintomas clínicos e desenvolvem a doença ativa. Outros 5-10% apresentam infecção latente, com possibilidade de reativação (Wayne 1994; Barry et al, 2009; Lin & Flynn 2010). Apesar disso, se a transmissibilidade da tuberculose não for controlada, a estimativa é de que entre 2000 e 2020, um bilhão de pessoas poderão ser infectadas e cerca de 35 milhões morrerão em decorrência da doença (WHO 2009).

A TB permanece como uma das maiores causas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo (Dye et al. 1999). Quando um indivíduo está infectado pelo HIV, a chance de desenvolver a TB ativa eleva-se em mais de 12% (WHO 2009). Durante o desenvolvimento da doença, os sinais e

sintomas são inespecíficos, se assemelham a um resfriado, e consistem em febre, sudorese noturna, perda de apetite, anorexia, mal-estar e caquexia. Posteriormente a pessoa apresenta expectoração sanguínea purulenta (Flynn & Chan 2001). Na maioria dos casos, as lesões parenquimatosas e ganglionares regredem de maneira espontânea, com calcificação radiologicamente visíveis. Em pacientes com transtornos imunes como a AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) a doença apresenta-se disseminada, com rápida progressão podendo ser fatal (Shimao 2003, 2005).

1.5 Formação do Granuloma

A fagocitose por macrófagos alveolares é o primeiro evento na relação do patógeno com o hospedeiro estando diretamente envolvida na evolução da doença (Ulrichs et al. 2004; Ulrichs & Kaufmann 2006), uma vez que constitui um dos primeiros mecanismos de eliminação do patógeno. É considerada uma etapa crítica, pois os receptores envolvidos na captura dos bacilos são essenciais para a ativação da imunidade adaptativa. Dentro de 2 a 6 semanas após a infecção, ocorre o desenvolvimento da imunidade mediada por células resultando em um influxo de linfócitos e monócitos ativados para o local da lesão resultando na formação do granuloma (Raja 2004). Portanto, a formação do granuloma requer a participação da imunidade adaptativa e é crítico para restrição da expansão bacteriana (Saunders & Cooper 2000).

Durante o desenvolvimento do granuloma, os macrófagos evoluem para células epitelióides e células gigantes multinucleadas que junto com os linfócitos e polimorfonucleares, circundam os macrófagos infectados formando a região central do granuloma. Na periferia são observados linfócitos T e B que modulam a resposta dos macrófagos. Logo após, há a proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos que irão nutrir somente as regiões mais externas dessa estrutura granulomatosa. Com o passar do tempo e de acordo com o crescimento do granuloma, pode ocorrer necrose caseosa da região central em decorrência da carência nutricional (Dannenberg 1991; Saunders & Cooper 2000) ou da presença do Mtb (Ulrichs & Kaufmann 2006).

A principal citocina envolvida na formação do granuloma é o TNF- α , liberado pelos macrófagos logo após a exposição a antígenos de Mtb. O TNF- α recruta neutrófilos e monócitos circulantes ao mesmo tempo em que outras citocinas, como o IFN- γ produzido pelas células T e pelas células NK (*Natural Killer*) potencializa as atividades microbidas, ativando macrófagos e células dendríticas (Wangoo et al. 2005; Flynn & Chan 2001). As células epitelióides e as células gigantes possuem a capacidade de ativar os fibroblastos a produzir colágeno e elastina, resultando em um aspecto mais consistente e rígido do granuloma (Wangoo et al. 2005).

O modelo clássico da iniciação da formação do granuloma tem sido evidenciado em estudos realizados com embriões de peixes zebra infectados com *M. marinum*, que são transparentes e permitem demonstrar a migração celular (Dannenberg 1991; Clay et al. 2007; Lesley & Ramakrishnan

2008). Estes estudos comprovam que a formação do granuloma está relacionada com todos os eventos descritos anteriormente, mas em contraste, sugerem que funciona como uma ferramenta para expandir a infecção micobacteriana (Davis & Ramakrishnan 2009). Neste contexto, o caminho da formação do granuloma e a subsequente disseminação bacteriana são baseados nas respostas dos macrófagos (recrutamento, fagocitose e apoptose) que geralmente induzem proteção, mas podem contribuir para a dispersão bacteriana (Davis & Ramakrishnan 2009).

1.6 Indução da Resposta Imune na Tuberculose

Acredita-se que o estabelecimento da doença ativa ou da infecção latente, depende da resposta imune do hospedeiro frente à presença do microrganismo. Os fagócitos, principalmente os macrófagos, apresentam diferentes receptores de superfície que promovem a fagocitose eficiente do Mtb, como os receptores de complemento (CR1, CR2, CR3 e CR4), que podem ser ativados através da ligação da proteína C3b na superfície da micobactéria, ativando assim a via alternativa do sistema complemento. A via da lectina do complemento também pode ser ativada através da ligação da lectina aos resíduos de manose da micobactéria (Aderem & Underhill 1999). Além disso, alguns componentes da micobactéria (como peptidoglicanas e proteínas) também podem interagir com os receptores *Toll like* (TLR2 e TLR4) dos macrófagos (Doherty & Ardite 2004), e induzirem a produção de citocinas (como a IL-12) importantes para o recrutamento e a ativação de células do sistema imunológico (Andersen 2007). Os receptores de manose também possuem fundamental importância na indução da resposta imune ao interagirem com as lipoarabinomanas presentes na superfície do Mtb (Ernst 1998).

Microrganismos fagocitados são sujeitos à degradação através de enzimas lisossomais após a fusão do fagossomo com o lisossomo (Cohn 1963). Com Mtb não é diferente. Após a fagocitose do Mtb, ocorre a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos, formando o fagolisossomos. Hidrolases ácidas presentes neste ambiente são responsáveis pela destruição da micobactéria. Este evento altamente regulado constitui um significativo mecanismo antimicrobiano de fagocitose (Raja 2004). O controle e a destruição da micobactéria dentro dos macrófagos ativados também são feitos através da produção de mediadores da oxidação, principalmente intermediários reativos do oxigênio (como o peróxido de hidrogênio) e do nitrogênio (como o óxido nítrico), que promovem a morte da micobactéria (Nicholson et al. 1996). Porém, essa habilidade dos mediadores da oxidação em eliminar a micobactéria até hoje só foi demonstrada em camundongos e ainda deve ser confirmada em humanos. Há somente evidências experimentais que mostram a importância do óxido nítrico na defesa do paciente na tuberculose pulmonar humana (Flech & Kaufmann 1987; Chan & Flynn 1999).

Os macrófagos constituem, portanto, as principais células da imunidade inata responsáveis pela resposta contra o Mtb (Raja 2004). Porém, além destes, outros componentes da resposta imune

inata compartilham desse processo. Tem sido descrito que as células dendríticas, os neutrófilos e as células NK apresentam grande participação nesse mecanismo (Junqueira-Kipnis et al. 2003). As células dendríticas capturam os bacilos no interior dos pulmões e migram para os linfonodos mediastinais onde ocorre a apresentação de antígenos a células T virgens, iniciando a ativação da resposta imune adaptativa (Saunders & Cooper 2000). Os neutrófilos promovem o aumento da quimiotaxia e participam das etapas iniciais da formação do granuloma (Edwards & Kirkpatrick 1986). As células NK podem lisar diretamente *Mtb* ou podem lisar monócitos/macrófagos infectados ao mesmo tempo em que podem ativar fagócitos no sítio de infecção (Raja 2004).

Inicialmente, após serem infectados, os macrófagos produzem principalmente IL-12, TNF- α e diferentes quimiocinas que recrutam outras células para o sítio de infecção. A IL-12 (principal citocina produzida na infecção por *M. tuberculosis*) é importante, pois induz a produção de IFN- γ pelos linfócitos, induz a proliferação dos linfócitos T, ativa células da imunidade inata, além de aumentar a citotoxicidade dos linfócitos T CD8 e das células NK (Sano et al. 1999; Junqueira-Kipnis et al. 2003). O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda em infecções causadas por microrganismos intracelulares e induz a formação do granuloma, que constitui um mecanismo de defesa do organismo para tentar isolar o patógeno e impedir a progressão da infecção (Sadek et al. 1998; Wangoo et al. 2005; Ulrichs & Kaufmann 2006). A partir daí, uma série de outras citocinas são produzidas e recrutam outros subtipos celulares para uma eficiente resposta ao *Mtb* (Silva & Boéchat 2004), onde são evidenciadas a participação das células T auxiliares (CD4+) e T citotóxicas (CD8+) (Barnes et al. 1992; Stenger et al. 1998; Araújo-Filho et al. 2008).

Várias subpopulações celulares têm sido descritas na resposta imunológica da TB. Uma das primeiras, melhor descrita e mais importante na proteção contra microrganismos intracelulares incluindo o *Mtb* é a subpopulação de células Th1 (Schluger 2001). As células Th1 são responsáveis pela produção de uma série de citocinas fundamentais para a ativação de outras células, como o IFN- γ que é a principal citocina envolvida na ativação dos macrófagos (Boehm et al. 1997). O IFN- γ produzido principalmente pelos linfócitos Th1 ativados, age sobre macrófagos e células dendríticas, além de outras células, potencializando a ação microbicida através do aumento da fagocitose e levando a uma maior produção de IL-12, TNF- α e mediadores da oxidação, fatores que levam a destruição da bactéria dentro das células fagocitárias (Chan et al. 1992; Cifone et al. 2001; Schluger 2001; Flynn & Chan 2001). Diversos estudos envolvendo camundongos têm demonstrado que as células Th1 são requeridas no controle da infecção (Orme & Collins 1984; Caruso et al. 1999). Acredita-se que a resposta imune Th1 específica em indivíduos com TB é eficaz e protetora, uma vez que defeitos em receptores de citocinas cruciais como do IFN- γ e da IL-12 estão associados com a suscetibilidade à infecção (Cooper et al. 1993; Newport et al. 1996; Park et al. 2008).

A avaliação da resposta imune específica aos antígenos MPT-51, GLcB e ESAT-6 de *Mtb* de pacientes com tuberculose pulmonar, demonstrou a existência de linfócitos TCD4⁺CD45RO⁺ positi-

vos tanto para IFN- γ quanto para IL-10. No mesmo estudo, resultados semelhantes foram obtidos para os linfócitos TCD8 efetores (Araújo-Filho et al. 2008). Camundongos imunizados com o antígeno recombinante MPT-51 e desafiados com Mtb também apresentaram células T efectoras e de memória específicas produtoras de IFN- γ no baço e no linfonodo poplíteo dos animais imunizados. A presença de altos níveis de anticorpos séricos da classe IgG1 e IgG2a, característicos das respostas Th2 e Th1, respectivamente, também foram encontrados (Silva et al. 2009). Esses resultados têm sugerido a existência de outras populações celulares envolvidas na proteção para a TB.

As células T reguladoras (Treg) são uma subpopulação de células TCD4⁺, que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) na superfície. O desenvolvimento e as funções dessas células são veiculados pelo fator de transcrição FOXP3 que também se faz um marcador de Treg (Fontenot et al. 2003, 2005). Em indivíduos saudáveis, constituem cerca de 5-10% de células TCD4⁺ circulantes. Essas células são essenciais para prevenir a autoimunidade e também regulam respostas imunes exacerbadas, através da produção de citocinas como IL-10 e TGF- β , suprimindo assim a ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺, principalmente contra patógenos que estabelecem infecções persistentes (James et al. 2000; Ribeiro-Rodrigues et al. 2006).

O envolvimento das células Treg na TB ainda não é totalmente conhecido. O primeiro sinal da participação destas células na TB foi proposta por Oldenhove et al (2003) que demonstraram que camundongos com depleção de células TCD4⁺CD25⁺ apresentaram altos níveis IFN- γ após infecção com Mtb (Oldenhove et al. 2003). Posteriormente, a participação destas células na infecção humana foi comprovada por Ribeiro-Rodrigues et al (2006) que demonstraram que a tuberculose ativa está associada à expansão de células TCD4⁺CD25^{high} que reprimem a ação de linfócitos T específicos (Ribeiro-Rodrigues et al. 2006). Estudos recentes mostram que o número de células Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no sangue periférico e nos sítios de infecção em pacientes com tuberculose ativa estão aumentados. Sabe-se que estes linfócitos T isolados do sangue são capazes de suprimir a produção de IFN- γ . Portanto, sugere-se que células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ podem suprimir a imunidade ao Mtb e assim contribuir para a patogênese da tuberculose humana (Chen et al. 2007). Hougardy et al (2007a) encontrou altos níveis de células Treg (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low}) no sangue periférico de pacientes com tuberculose, em comparação com pacientes com TB latente, indivíduos saudáveis e controles não infectados. Eles também demonstraram que células T reguladoras com fenótipo CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low} podem ser expandidas *in vitro* com antígenos micobacterianos de indivíduos portadores de infecção latente. Indivíduos saudáveis não apresentam expansão destas populações celulares. Durante a infecção, a principal função das células Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) poderia ser o controle da inflamação intensa, induzida no local da infecção, evitando danos teciduais (Hougardy et al. 2007b). No entanto, esta regulação imune pode contrariar a função das células T efectoras CD4⁺ e CD8⁺ e paradoxalmente atrapalhar o controle de infecção (Burl et al. 2007).

Já foram caracterizados vários fenótipos de células Treg através das citocinas produzidas por tais células. Células TCD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10 são caracterizadas como células Tr1 (Fontenot et al. 2003). Já as células com o mesmo fenótipo, porém produtoras de TGF- β são chamadas de células Th3 (Fontenot et al. 2003). Existem também as células Treguladoras naturais (TCD4⁺CD25⁺) formadas no timo durante o processo de desenvolvimento e maturação dos linfócitos T (Belkaid & Rouse 2005). As células TCD4⁺ com fenótipo regulador, produtoras de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β já foram identificadas em pacientes com tuberculose ativa antes da caracterização de células Treg nesses pacientes (Gerosa et al. 1999). Além da produção de citocinas inibitórias, outro mecanismo de inibição das células Treg é o consumo de IL-2 do meio, impedindo a proliferação de células (Belkaid & Rouse 2005). Além disso, elas possuem a capacidade de induzir inibição por contato direto com outras células através da expressão da molécula de superfície CTLA-4, que se liga nas moléculas co-estimuladoras das células apresentadoras de antígenos e dos linfócitos T, induzindo sinais intracelulares inibitórios (Shevach 2002).

Outra subpopulação de células T auxiliares que foi recentemente descrita e demonstrada em indivíduos com tuberculose ativa e latente (Scriba et al. 2008; Curtis & Way 2009; Chen et al. 2010) é a Th17. Esta subpopulação expressa seletivamente o receptor da IL-23 (IL-23R), o CCR6 e o fator de transcrição que induz a diferenciação dessas células em humanos que é o RORc2 e são geradas na presença de IL-23, IL-1, IL-6 e TGF- β sozinhas ou combinadas (Annunziato et al. 2007; Kimura et al. 2007; Van de Veerdonk et al. 2009; Crome et al. 2009). As células Th17 constituem uma subpopulação de linfócitos TCD4⁺ que produzem várias citocinas inflamatórias como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23 e por isso caracterizada como células pró-inflamatórias. Estas citocinas são responsáveis por ativar outros tipos celulares e induzir uma intensa resposta inflamatória. Evidências recentes têm sugerido que durante a infecção com Mtb, há produção de IL-17 por células Th17, apesar do seu papel na doença ser controverso, uma vez que podem recrutar células Th1 através da produção de quimiocinas (Khader et al. 2007). Tem sido descrito que as células Th17 estão envolvidas nos estágios iniciais da infecção, durante a formação do granuloma, através do recrutamento de neutrófilos (Curtis & Way 2009; Pelletier et al. 2009). A eliminação de células Th17 em camundongos leva a um acúmulo de células Th1 no pulmão e um aumento do dano tecidual, indicando o papel crucial destas células na patogenia da TB (Khader et al. 2007). Além disso, citocinas Th1, como o IFN- γ regulam negativamente a indução de IL-17 (Cruz et al. 2009).

As citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17 e o TNF- α , também são associados com doenças auto-imunes como, por exemplo, a artrite reumatóide (AR) (Furuzawa-Carballeda et al. 2007). A artrite reumatóide é uma doença auto-imune de etiologia ainda não totalmente elucidada caracterizada por uma inflamação crônica das articulações (Aarvak & Natvig 2001). A destruição do tecido cartilaginoso e ósseo se deve à atuação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases sintetizadas em excesso, que em ação conjunta com macrófagos, fibroblastos, células dendríticas e linfócitos

T e B contribuem para a patogênese dessa doença (Arend & Dayer 1995; Weyand et al. 2000; Skapenko et al. 2006). A resposta imune dos pacientes com AR envolve a ativação de vários subtipos de células T, células B e produção de auto-anticorpos (fator reumatóide) (van Venrooij et al. 2006). As células TCD4⁺ ativadas estimulam a produção de citocinas por monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais. As principais citocinas produzidas são IL-1, IL-6 e TNF- α que estimulam as células da membrana sinovial a produzir collagenases e outras proteases ativando os condrócitos que promovem a destruição da cartilagem (Lipski 2006; Choy et al. 2001). Tem sido descrito que o TNF- α e as subpopulações de células Th1 e Th17 são os principais responsáveis pela reação inflamatória na doença (Aarvak et al. 1999; Furuzawa-Carballeda et al. 2007; Andersson et al. 2008).

Em países endêmicos para a TB, os pacientes com AR assim como a população em geral, podem ser expostos ao *M. tuberculosis* e podem desenvolver tuberculose ativa ou infecção latente. O alvo do tratamento da AR são os sintomas clínicos, nas quais são administradas drogas antiinflamatórias, glicocorticóides e drogas modificadoras do curso da doença para tratar a dor e melhorar a qualidade de vida do paciente. Porém, tem sido observado que nem sempre os pacientes respondem bem a esse tratamento, permanecendo com sintomas articulares importantes ou podem apresentar efeitos colaterais graves (Lipski 2006; Bértolo et al. 2007). Avanços biotecnológicos recentes permitiram uma melhor compreensão da fisiopatogenia da doença e a produção de agentes biológicos geneticamente construídos dirigidos contra elementos considerados com papel central na instalação e progressão da sinovite reumatóide e o conseqüente bloqueio da destruição cartilaginosa e óssea, como as citocinas IL-1 e TNF- α . Nesses casos, onde os pacientes persistem com sintomatologia são indicados os agentes biológicos, como os anti-TNF- α (Bértolo et al. 2007). O bloqueio do TNF- α tem um efeito mais global na inflamação da AR quando comparado ao bloqueio de outras citocinas, como a IL-1 por exemplo (Choy et al. 2001). Porém, a terapia utilizando antiinflamatórios e drogas inibidoras de TNF- α têm sido associadas com a reativação da tuberculose em pacientes com AR (Keane 2001; Wallis et al. 2001; Gardam et al. 2003). E como já foi dito anteriormente, o TNF- α assim como outras citocinas pró-inflamatórias, possui papel essencial na tuberculose na formação e manutenção dos granulomas (Wangoo et al. 2005; Flynn & Chan 2001). A partir disso, os pacientes com AR constituem um grupo de alto risco de desenvolvimento da TB ativa.

A resposta imune humoral, induzida por linfócitos Th2, não é protetora para a tuberculose, mas pode sim comprometer a imunidade mediada por células Th1. As citocinas produzidas pelas células Th2 induzem a produção de anticorpos pelos linfócitos B e inibem a ativação de células, regulando a resposta imunológica exacerbada (Silva & Boéchat 2004; Maglione et al. 2007). Caracterizam-se pela produção de citocinas como IL-4 e IL-5, que ativam os linfócitos B. Estes se transformam em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos. Entretanto, estes anticorpos específicos para o agente bacteriano parecem conferir pouca ou nenhuma imunidade protetora contra a micobactéria (Maglione et al. 2007). Os anticorpos irão opsonizar Mtb e suas proteínas secretadas, facilitando

o reconhecimento pelas células do sistema imune (Flynn & Chan, 2001). Modelos murinos de infecção com *Mtb* contestam a ação dos anticorpos e, por conseguinte dos linfócitos B na proteção a esta infecção, mesmo demonstrando a presença de estruturas semelhantes a folículos linfóides ricos em linfócitos B nos granulomas pulmonares (Orme 2003; Junqueira-Kipnis et al. 2006). O papel dos anticorpos na resposta imune humana à tuberculose é pobremente entendido e na maioria das vezes é utilizado apenas para o diagnóstico da doença. Além disso, a IL-4 reduz a apoptose de células infectadas mediada por TNF- α , aumenta a proliferação de células T reguladoras e contribui para a imunopatologia da doença através do aumento da fibrose pulmonar (Rook 2007).

1.7 Mecanismos de Evasão da Micobactéria

A interferência nos mecanismos de defesa do hospedeiro é crucial para a sobrevivência de *Mtb* nas células e para instalar a infecção que pode resultar no desenvolvimento da doença ativa (Daffé & Etienne 1999). *Mtb* utiliza diferentes estratégias para escapar da resposta imunológica no indivíduo infectado. Como exemplo, a presença da bactéria no interior dos macrófagos e células dendríticas, induz a diminuição da expressão de moléculas de MHC II, necessárias para a apresentação de antígenos micobacterianos, reduzindo assim a apresentação antigênica e favorecendo a persistência dentro do seu nicho (Hmama et al. 1998; Kaene et al. 1997).

As micobactérias patogênicas são capazes de inibir a fusão do fagossoma com o lisossoma através da liberação de derivados sulfatados a partir de uma glicoproteína presente na sua parede celular (trehalose 2-sulfato) que impede a maturação do lisossoma. Além disso, uma proteína de superfície que possui aspartato e triptofano (TACO) é retida no fagossoma primário pela micobactéria e impede a fusão com os lisossomas maduros (Kaene et al. 1997; Kaufmann 2001). Caso ocorra a união do fagossoma com o lisossoma, as micobactérias liberam grandes quantidades de amônia e alcalinizam o conteúdo intralissossomal, inativando enzimas que seriam importantes no combate a micobactéria (Flynn & Chan 2001; Ulrich & Kaufmann 2006).

Mtb apresenta algumas estratégias para obter ferro (Fe^{3+}), que é necessário para sua sobrevivência, mas também é importante para os macrófagos que o utilizam como co-fator para indução de mecanismos bactericidas. No macrófago infectado inicia-se então uma competição para aquisição desta molécula. As células do hospedeiro adquirem o ferro através do receptor transferrina (TfR) que captura o ferro extracelular e o internaliza. Este complexo se dirige aos endossomas primários, compartimento onde as condições de pH facilitam a liberação do ferro da transferrina e este pode então ser utilizado. O *Mtb* possui sideróforos, que são moléculas especializadas que tem alta afinidade pelo ferro intracelular. Os sideróforos se ligam ao ferro e o transferem para micobactinas, fatores quelantes de ferro que competem com a transferrina na captura deste elemento (Collins & Kaufmann 2001).

A complexa parede celular de *Mtb*, que pode ser visualizada através da microscopia eletrônica em células infectadas, separa as micobactérias do conteúdo fagolisossomal, que seria potencialmente tóxico para o patógeno. Presume-se que o conteúdo lipídico da parede celular impede a degradação do bacilo pelas enzimas das células de defesa do hospedeiro. Além disso, existem na parede celular algumas substâncias, como a catalase, a peroxidase e a superóxido desmutase, que são capazes de inativar intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, que seriam capazes de atravessar a parede da micobactéria e induzir a sua destruição (Daffé & Ettiene 1999; Maldonado 1999).

Alguns componentes específicos da parede celular, como a LAM, são considerados moduladores da resposta imune, uma vez que isolados de *M. tuberculosis* têm causado supressão da proliferação de linfócitos T (Chatterjee et al. 1991) e interferindo na ativação dos macrófagos (Sibley et al. 1988). Além disso, a LAM inibe a ativação da proteína quinase e está diretamente envolvida na evasão aos mediadores da oxidação (Chan et al. 1991). Os glicolípídeos fenólicos e o fosfatidil inositol presente na parede das micobactérias também são capazes de inibir a proliferação de macrófagos e de linfócitos, inibindo os principais mecanismos bactericidas (Mohaghehpour et al. 1998).

Analisando as cepas virulentas de *M. tuberculosis*, encontrou-se uma substância produzida pelos bacilos que permitem que eles se unam de forma compacta e paralela no crescimento em meios de cultura formando cordões. Essa substância foi chamada de fator Corda ou Trehalose 6,6 dimicolato e constitui a parede celular das micobactérias. Esta substância é capaz de inibir a respiração e a fosforilação oxidativa através da atuação direta sobre as mitocôndrias. Do mesmo modo, ela inibe a migração de leucócitos polimorfonucleares e possui atividade granulomatogênica além de modular a produção de citocinas e óxido nítrico na TB (Daffé & Ettiene 1999; Lima et al. 2001).

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença grave que possui tratamento, diagnóstico e prevenção, mas apesar disso, ainda preocupa as organizações de saúde devido ao seu difícil controle e à sua velocidade de disseminação. Ainda que nos seus primórdios esta doença tenha sido associada principalmente às condições sanitárias e socioeconômicas, hoje se percebe que as barreiras sociais foram abolidas e a comorbidade com o HIV e o surgimento de bacilos multi-droga resistentes, predispõem toda a sociedade ao risco eminente de se infectar pelo Mtb.

A cada dia 25.000 pessoas adoecem por tuberculose no mundo todo. Estes números fazem da TB a principal causa de morte por doença infecciosa curável em adultos (WHO 2009). No Brasil os números também são alarmantes. Em 2007 foram notificados mais de noventa mil casos novos de TB no país e a taxa anual de incidência notificada no Estado de Goiás foi de 23,5 por 100.000 habitantes e em Goiânia 25,8 para o mesmo período (MS, DATASUS 2009).

Apesar da existência de vários métodos laboratoriais para diagnóstico, a erradicação de TB é uma meta muito difícil devido ao fato do Mtb ser capaz de permanecer no hospedeiro por longos períodos de tempo na forma de latência (Wayne 1994). O controle e processo de eliminação da epidemia global de tuberculose são possíveis através da identificação e tratamento de indivíduos com TB latente, em particular de indivíduos que recentemente adquiriram a infecção. Além disso, o entendimento da função de muitas subpopulações celulares envolvidas na imunologia da tuberculose visa facilitar a resolução destes problemas (Bonecini-Almeida et al. 2004; Brandt et al. 2004).

A Prova Tuberculínica, exame utilizado para detecção de tuberculose latente apresenta uma série de limitações (Teixeira et al. 2007). Além disso, várias doenças que utilizam drogas imunomoduladoras no seu tratamento, como a AIDS e a AR, são consideradas de risco para a progressão de tuberculose ativa recentemente adquirida ou para a reativação da infecção remotamente adquirida (Gardam et al. 2003; WHO 2009). A compreensão dos fatores imunológicos envolvidos na transição da infecção latente para a doença ativa seria fundamental para o combate dessa doença.

Apesar do vasto conhecimento da imunologia desta infecção, ainda não é possível atingir as metas propostas de erradicação, pois muito ainda precisa ser elucidado (Ardeleanu et al. 2004). Devido a essas observações que têm sido feitas acerca de diversas subpopulações celulares envolvidas na resposta imune contra o *M. tuberculosis*, um estudo mais detalhado que vise esclarecer os mecanismos imunológicos dessa doença facilitariam o entendimento da sua patogenia e permitiriam o desenvolvimento de novos testes diagnósticos e vacinas mais eficientes.

Em virtude disso, a avaliação da resposta imune das subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th1, Th17 e T reguladores) através da investigação das diferentes citocinas produzidas por estas células em indivíduos saudáveis, indivíduos com infecção latente, pacientes com TB ativa, pacientes com AR e pacientes com AR que desenvolveram TB ativa em resposta ao antígeno recombinante GLcB do *M. tuberculosis* podem contribuir para o entendimento do mecanismo de combate à TB.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a participação das subpopulações de células Th1, Th17 e T reguladoras no desenvolvimento da tuberculose ativa

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar por citometria de fluxo o fenótipo das células Th1, Th17 e T reguladoras de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, tuberculose latente (PT positivos) e controles saudáveis (PT negativos).
- Determinar a resposta imune de células Th1, Th17 e T reguladoras específicas ao antígeno recombinante GLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, tuberculose latente (PT+) e controles saudáveis (PT-) avaliando-as quanto à sua positividade para IFN- γ , IL-17, IL-10 e TGF- β através da citometria de fluxo
- Verificar e analisar o papel das células Th1, Th17 e Treg em uma coorte de pacientes com artrite reumatóide classificados em PT+ e PT- com a resposta imune observada em pacientes com AR que desenvolveram TB.
- Analisar a atividade das células Th1, Th17 e T reguladoras em indivíduos com tuberculose ativa (TB e TBAR).
- Avaliar a função específica das células T reguladoras de pacientes com tuberculose pulmonar ativa através de ensaio funcional realizado *in vitro* observando a proliferação celular.

4. METODOLOGIA

4.1 População de estudo

A coleta das amostras do estudo de corte transversal que envolveu a avaliação dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás de acordo com o Processo HC/UFG n. 055/2009 (ANEXO 1). Foram recrutados 21 pacientes com tuberculose pulmonar ativa (média de idade = 41.9 anos), independente da etnia, sexo ou idade, com diagnóstico de tuberculose confirmado por baciloscopia, exame radiológico positivo ou cultura de *M. tuberculosis* positiva. Controles saudáveis pareados por sexo e idade aos pacientes selecionados foram recrutados, totalizando 12 controles saudáveis PT negativos e 11 controles saudáveis PT positivos. Todos os indivíduos foram recrutados no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (HDT) e no Hospital das Clínicas de Goiânia (HC).

Em virtude de avaliar a resposta imune envolvida na transição da infecção latente para a doença ativa, realizamos um estudo longitudinal onde foram recrutados 25 pacientes com artrite reumatóide (média de idade = 51 anos) que foram acompanhados durante o período de um ano (2008-2009). Esses pacientes recrutados eram ou não candidatos ao uso de drogas inibidoras do TNF- α , independente da etnia ou do sexo, com diagnóstico de artrite reumatóide confirmado de acordo com os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology* 2002). Apesar de nenhum dos pacientes terem sido submetidos ao tratamento com drogas anti-TNF- α , durante o acompanhamento destes pacientes, três deles (média de idade = 48.3 anos) desenvolveram tuberculose pulmonar ativa ao longo do estudo. A partir disso, avaliamos também a resposta imune dos pacientes com AR (n=22) e dos pacientes com AR que desenvolveram TB ativa (TBAR=3). Este estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás de acordo com o Processo HC/UFG n. 195/07 (ANEXO 2). Todos os pacientes com AR foram recrutados no Hospital das Clínicas de Goiânia (HC). Indivíduos menores de 18 anos, portadores de qualquer imunodeficiência ou infectados pelo HIV não foram incluídos nesse estudo.

4.2 Coleta das amostras

Depois de preenchido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXOS 3 e 4) e um questionário sócio-epidemiológico (ANEXOS 5 e 6), amostras de sangue periférico foram obtidas por punção intravenosa a vácuo através da coleta de 20 mL de sangue em tubos *Vacutainer* contendo heparina (Becton & Dickinson) dos indivíduos controles e dos pacientes com tuberculose no momento do diagnóstico, até no máximo 5 dias de tratamento. A coleta das amostras dos pacientes com artrite reumatóide foi feita durante consulta de rotina para acompanhamento da terapêutica.

Todo o material utilizado era descartável e o procedimento de coleta de sangue seguiu as normas de biossegurança padronizadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

4.3 Realização da Prova Tuberculínica

Todos os controles deste estudo e os pacientes com AR foram submetidos à prova tuberculínica (PT) para permitir a classificação em indivíduos PT negativa ou PT positiva. O teste consistiu na aplicação intradérmica de 100 µL PPD RT-23551 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) no antebraço esquerdo de cada participante. A leitura da enduração cutânea foi realizada 72 horas após a aplicação e os controles que apresentaram enduração maior ou igual a 10mm foram classificados como PT positivos (TB latente), enquanto os pacientes com AR foram classificados em PT positivos quando apresentaram enduração maior ou igual a 5mm, conforme preconizado pela OMS.

4.4 Antígeno Protéico

Neste estudo, foi utilizado o antígeno protéico recombinante GLcB (rGLcB) de *M. tuberculosis*, que foi produzido no Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

4.5 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico e Cultura Celular

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade com *Ficoll-Paque Plus* (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). O sangue total coletado foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,9% estéril) na proporção de 1:1 e em seguida pipetado cuidadosamente em 3 vezes o volume em solução de *Ficoll-Paque Plus* (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) em um tubo de poliestireno tipo Falcon 50mL (TPP, Switzerland) sendo, posteriormente centrifugado a 1000 x g por 20 minutos a 23°C formando assim uma interface entre os líquidos (anel branco). O anel de células mononucleares foi coletado usando pipeta Pasteur e transferido para um novo tubo de poliestireno tipo Falcon 15mL (TPP, Switzerland). Para lavagem do mesmo, foi adicionado 12mL de PBS 0,9% e decorrido o período de centrifugação de 10 minutos a 1000 x g a 4°C o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi ressuspenso em 2mL de meio RPMI completo (RPMI Medium 1640 GIBCO™ + 0,15% de Bicarbonato de sódio, 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina 200mM SIGMA®, 1% de Penicilina-estreptomicina SIGMA®, 1% de Piruvato de sódio SIGMA®, 1% de Aminoácidos não essenciais 100X SIGMA®). A concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL por orifício após a contagem em câmara de *Neubauer*. Foram pipetados 200 µL da suspensão celular em cada poço da placa de cultura celular de

poliestireno de 96 orifícios (Cell WellsTM) e as células foram cultivadas na ausência de estímulo (MEIO), estimuladas com PHA (Phytohemagglutinin GibcoBRL Cat. Nº 10576-015 Life TechnologiesTM) em um dos orifícios e em outro com o antígeno rGLcB na concentração de 1 µg/ml em estufa a 5% de CO₂ na temperatura de 37°C durante 4 horas (*ex vivo*).

4.6 Análise das subpopulações de células T (Th1, Th17 e T reguladoras) quanto à positividade para as citocinas IFN- γ , IL-17, TGF- β e IL-10

As culturas de PBMCs foram tratadas com monensina para o bloqueio do complexo de golgi (Golgi Stop BDTM) e incubadas por 4-6 horas a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Após esta etapa foram acrescentados 200 µL de PBS azida sódica em cada orifício das placas de cultura celular e estas foram incubadas por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a 2000 xg por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e foram adicionados 10 µL de cada anticorpo monoclonal de superfície celular, seguindo a marcação de cada painel para determinada subpopulação (painel 1 = Th1; painel 2 = Treg IL-10+; painel 3 = Treg TGF- β + e painel 4 = Th17), conforme quadro 1. Foram utilizados controles de isotipos em cada experimento. Após incubação por 30 minutos a 4°C, as suspensões celulares foram tratadas com PBS paraformaldeído 0,4%; azida sódica 0,1% por 15 minutos a 4°C. Depois de centrifugadas a 5000 xg por minutos, 100 µL de Perm Wash (Perma/WashTM Buffer 10x stock) foi adicionado a cada orifício da placa de cultura celular e incubado por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação a 5000 xg por 5 minutos a 4°C, foram adicionados 10 µl de cada anticorpo monoclonal para marcação intracelular, conforme quadro 1. Todos os anticorpos utilizados eram da eBioscience ou da BD Pharmingen. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C e em seguida foi acrescentado Perm wash 1X, centrifugando em 5000 xg por 5 minutos a 4°C. As células foram ressuspendidas em PBS, azida sódica 0.1%. As aquisições foram realizadas em citometro de fluxo (BD FAC Scalibur, San Jose, Califórnia) no Hospital Araújo Jorge. Para obtenção do número absoluto de células TCD4+ e T reguladoras no sangue periférico dos indivíduos estudados, a porcentagem de cada uma dessas subpopulações foi multiplicada pelo total de leucócitos de cada indivíduo.

4.7 Imunocitoquímica

Foi realizada imunocitoquímica de PBMCs de pacientes e controles saudáveis para confirmar a presença de células T reguladoras no sangue periférico destes indivíduos. As células submetidas a imunocitoquímica foram tratadas conforme descrito por Valli et al (2009). Previamente, as PBMCs foram concentradas usando a técnica de Cytospin, foram fixadas na lâmina com acetona (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), e em seguida embebidas em uma solução salina tamponada com Tris (TBS) e incubadas com TBS e peróxido de hidrogênio (3%, pH 7.4) por 20 minutos. As amostras foram incubadas com anticorpos primários monoclonais (anti-CD4, anti-CD25 e anti-

FOXP3 da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) por 18 horas a 4°C. Após lavagem com TBS, as amostras foram tratadas com EnVision[®]+ Dual Link System-HRP (Dako Corporation, Carpinteria, CA) ou LSAB[®]+ System HRP Peroxidase Kit (Dako). Em seguida, foram incubadas em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako) por 2 a 5 minutos e coradas com hematoxilina de Mayer e protegidas da luz. Amostras de tonsilas foram usadas como controles positivos para todas as marcações. Controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários e substituição do TBS por PBS com 1% de Soro Bovino Fetal e soro de coelho (X0902, Dako) ou camundongo (X501-1, Dako) não-imunes. A técnica de imunocitoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. As lâminas foram analisadas no microscópio Axio Scope.A1 (Carl Zeiss) e as fotomicrografias foram feitas no programa Axion Vision 4.7.

4.8 Ensaio Funcional

Foi avaliada a função das células Treg na tuberculose através da avaliação da inibição da proliferação celular. Células TCD4⁺ foram separadas através da marcação com anticorpos conjugados com esferas magnéticas e obtidas por seleção negativa conforme protocolo do kit de isolamento de células T reguladoras humanas (Regulatory T Cell Isolation Kit II for human, MACS, Miltenyi Biotec[®]). Células CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} foram isoladas de PBMCs de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, onde células CD4⁺ foram selecionadas negativamente através da marcação com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com esferas magnéticas contendo anti-CD8, anti-CD19, anti-CD123 e anti-CD127 e foram passadas por uma coluna de separação magnética. A solução eluída contendo somente células CD4⁺ foi submetida à nova marcação celular com anticorpo monoclonal conjugado com esferas magnéticas anti-CD25 e submetida a uma nova passagem em coluna de separação magnética. As células que ficaram na coluna caracterizadas como células Treg (CD4⁺CD25⁺) foram eluídas por pressão da coluna. PBMC total autólogo foram tratados com CFSE (10 µM) por 10 minutos em PBS 0,1% de Soro Bovino Fetal e incubadas em placas de 96 poços (2x10⁵ cels/mL) em meio RPMI completo (RPMI Medium 1640 GIBCO[™] + 0,15% de Bicarbonato de sódio, 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina 200mM SIGMA[®], 1% de Penicilina-estreptomicina SIGMA[®], 1% de Piruvato de sódio SIGMA[®], 1% de Aminoácidos não essenciais 100X SIGMA[®]) na estufa 5% de CO₂ a 37°C na presença de anti-CD3 (1ng/mL) (clone UCHT1). As células Treg separadas magneticamente (1x10⁶ cells/mL) foram pré-ativadas com rIL-2 (5U/mL) e foi realizada co-cultura com PBMCs total autólogo marcado com CFSE na presença PHA (1 µg/mL) ou de rGLcB (1 µg/mL). Após seis dias de cultura em estufa a 37°C com 5% CO₂ a análise da proliferação celular das co-culturas [Treg (2):PBMC(1)] foi realizada por citometria de fluxo (BD FAC Scalibur, San Jose, Califórnia) no Hospital Araújo Jorge.

4.9 Análise Estatística

Para análise da aquisição foram utilizados o programa BD FACSDiva Software[®]. A tabulação e construção dos gráficos foram feitas através dos programas GraphPad Prism 5 Microsoft[®] e Excel[®]. A mediana e o desvio padrão, bem como a amplitude de variação dentro de cada grupo foram calculados para avaliar os resultados. Depois de analisar a normalidade dos dados através de gráficos quantitativos, foi utilizado o teste de ANOVA (Kruskal Wallis) para comparar as variações entre os grupos. Como a variação da magnitude de cada grupo não foi diferente, um F-teste e um valor de p foram calculados para prever as diferenças entre os resultados médios de cada grupo. Um teste pos hoc (test t de Student ou Mann Whitney-Wilcoxon) foi utilizado para avaliar se cada par de grupos específicos eram diferentes uns dos outros. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Quadro 1. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo para marcação celular.

Anticorpos	Painel	FITC	PE	PerCP	APC
Superfície e Intracelular	1	IFN- γ (4S.B3)	T-bet (4B10)		CD4 (RPA-T4)
	2	FOXP3 (PCH101)	IL-10 (JES3-9D7)	CD25 (BC96)	CD4 (RPA-T4)
	3	FOXP3 (PCH101)	TGF- β (TB21)	CD25 (BC96)	CD4 (RPA-T4)
	4	IL-23R (BAF1400)	IL-17 (64DEC17)		CD4 (RPA-T4)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína, PE: Ficoeritrina, PerCP: Proteína Peridina de Clorofila, APC: Alofocianina. O clone de cada anticorpo utilizado está indicado entre parênteses.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil sócio-epidemiológico dos participantes

A população do estudo transversal incluiu 21 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, com média de idade de 41.9 anos, variando de 23 a 60 anos de idade. Somente 38,09% desses pacientes eram do sexo feminino (n=8) enquanto 61,91% eram do sexo masculino (n=13). Destes, 19,04% não eram vacinados com BCG (n=4) e 14,28% não souberam responder e não apresentavam cicatriz vacinal (n=3), enquanto todos os indivíduos PT- eram vacinados com BCG na infância e somente 18,18% dos indivíduos PT+ não eram vacinados (n=2).

A população do estudo longitudinal incluiu 22 pacientes com artrite reumatóide (AR) com média de idade de 51.0 anos, variando de 21 a 75 anos de idade. Destes pacientes, somente 9% eram do sexo masculino (n=2) enquanto a maioria era do sexo feminino 90,9% (n=20). Dos pacientes com AR 36,3% (n=8) não eram vacinados com BCG e 9% (n=2) não souberam responder e não apresentavam cicatriz vacinal. A média de idade dos pacientes com TBAR foi de 48.3 anos, variando de 41 a 62 anos. Todos os pacientes com TBAR eram do sexo feminino (n=3) e 33,3% (n=1) não apresentavam cicatriz vacinal de BCG e não souberam responder sobre a vacinação. Os resultados podem ser analisados na tabela 1. Somente 18,18% dos pacientes com AR apresentaram resultado da PT positiva (n=4). Porém, nenhum dos pacientes que desenvolveram tuberculose ativa, era PT positivos.

5.2 Análise das células TCD4+

Para analisar as diferentes subpopulações de células T auxiliares (CD4⁺), inicialmente analisou-se a porcentagem das células TCD4⁺ e o total dessas células no sangue periférico de pacientes com TB ativa, indivíduos com TB latente e controles saudáveis. As células dos pacientes e dos controles PT negativos e PT positivos foram analisadas por citometria de fluxo. Inicialmente as células foram analisadas de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC), onde foi selecionada a população de linfócitos (Figura 2A). Em seguida, foi realizada a seleção da população de células CD4⁺ de acordo com a fluorescência, utilizando o parâmetro da granulosidade (Figura 2B). A porcentagem destas células foi avaliada e comparada com indivíduos com TB latente e controles saudáveis. Observou-se que pacientes com TB ativa apresentavam porcentagem similar de células TCD4⁺ comparado aos indivíduos com TB latente e aos controles saudáveis (Figura 2C). Porém, quanto à quantidade total de células TCD4⁺ verificou-se que pacientes com TB ativa tinham maior quantidade dessas células no sangue periférico quando comparado com indivíduos saudáveis, mas não apresentam diferença significativa quando comparou-se com indivíduos com TB latente (Figura 2D).

5.3 Análise de células Th1 IFN- γ +

As células dos pacientes com TB ativa e dos controles PT negativos e PT positivos foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com os parâmetros necessários para caracterizar as subpopulações celulares. Inicialmente as células foram analisadas de acordo com o tamanho (FSC) e a granulidade (SSC), onde foi selecionada a população de linfócitos (Figura 3A). Em seguida, foi realizada a seleção da população de células $CD4^+$ de acordo com a fluorescência, utilizando o parâmetro da granulidade (Figura 3B). A partir destes linfócitos foram selecionadas as subpopulações celulares de interesse de acordo com cada marcador específico. Para selecionar as células Th1 ($CD4^+T\text{-bet}^+IFN-\gamma^+$), caracterizou-se as células T $CD4^+$ que expressavam o fator de transcrição T-bet (indutor da produção de $IFN-\gamma$) e avaliou-se quanto a positividade para $IFN-\gamma$ (Figura 3C). Os pacientes com tuberculose, independente da forma clínica da doença (ativa ou latente) apresentam células Th1 específicas para o antígeno recombinante GLcB (Figura 4C), enquanto que os controles saudáveis PT- não apresentavam células específicas para o referido antígeno (Figura 4C). Além disso, notou-se que os pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentam maior porcentagem de células Th1 específicas quando comparado com os indivíduos com tuberculose latente (Figura 4C).

Tabela 1. Características clínicas, radiológicas e laboratoriais dos grupos estudados.

<i>Características</i>	<i>Controles Saudáveis PT- (n=12)</i>	<i>TB Latente PT+ (n=11)</i>	<i>TB Ativa (n=21)</i>	<i>AR (n=22)</i>	<i>TBAR (n=3)</i>
Homens, N° (%)	8 (66.6)	5 (45.4)	13 (61.9)	2 (9)	0 (0)
Mulheres, N° (%)	4 (33.3)	6 (54.5)	8 (38.0)	20 (90.9)	3 (100)
Idade, anos	37.2 (20-59)	37.1 (21-60)	41.9 (23-60)	51.0 (21-75)	48.3 (41-62)
BCG, N° (%)	12 (100)	9 (81.8)	14 (66,6)	14 (63.3)	2 (66.6)
PT+, N° (%)	ng ^s	11 (100)	6 (28.5)	4 (18.18)	0 (0)
TB pulmonar, N° (%)	ng ^s	ng	21 (100)	Ng	3 (100)
Cavitação Pulmonar, N° (%)	ng ^s	ng	7 (33.3)	Ng	3 (100)
Raio-X Suspeito, N° (%)	ng ^s	ng	19 (90.4)	Ng	3 (100)

TB: Tuberculose, PT: Teste de Sensibilidade a Tuberculina, BCG: Bacillus Calmette Guérin

ng: negativo

^s: Critério de inclusão no grupo controle.

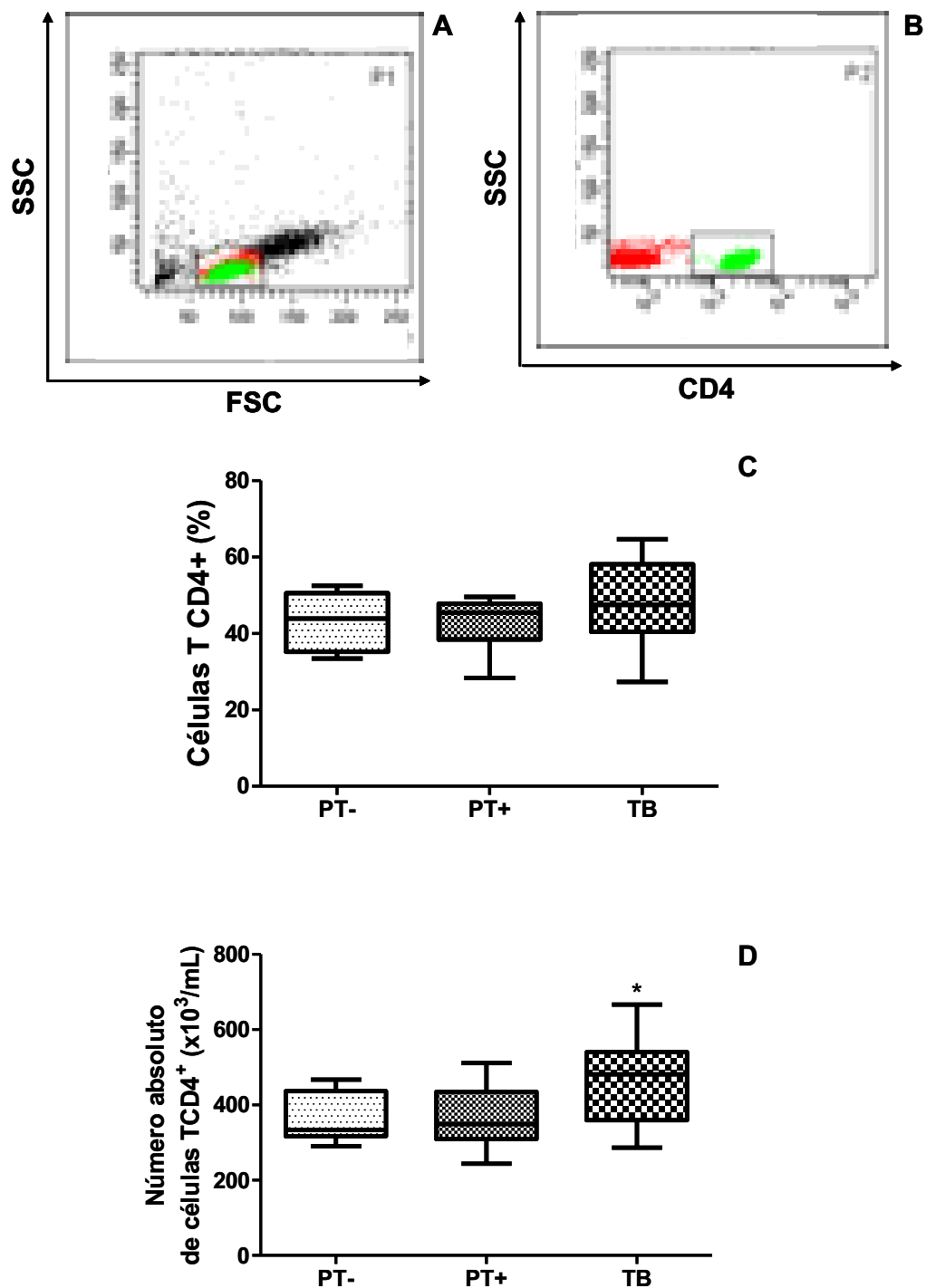


Figura 2. Pacientes com TB ativa apresentam maior número de células TCD4⁺ totais no sangue periférico. Exemplos de *Dot Plots* de citometria de fluxo representando a seleção de células TCD4⁺. A, Seleção de linfócitos do sangue periférico de um dos pacientes com tuberculose de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). B, Seleção da população de células TCD4⁺ de acordo com a fluorescência. C, Porcentagem de células TCD4⁺ de todos os grupos estudados. D, Número absoluto de células TCD4⁺ de todos os grupos estudados. Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos. * Diferença significativa entre os pacientes com TB (n=21) comparados com os controles PT+ (n=11) e PT- (n=12) (p<0,05).

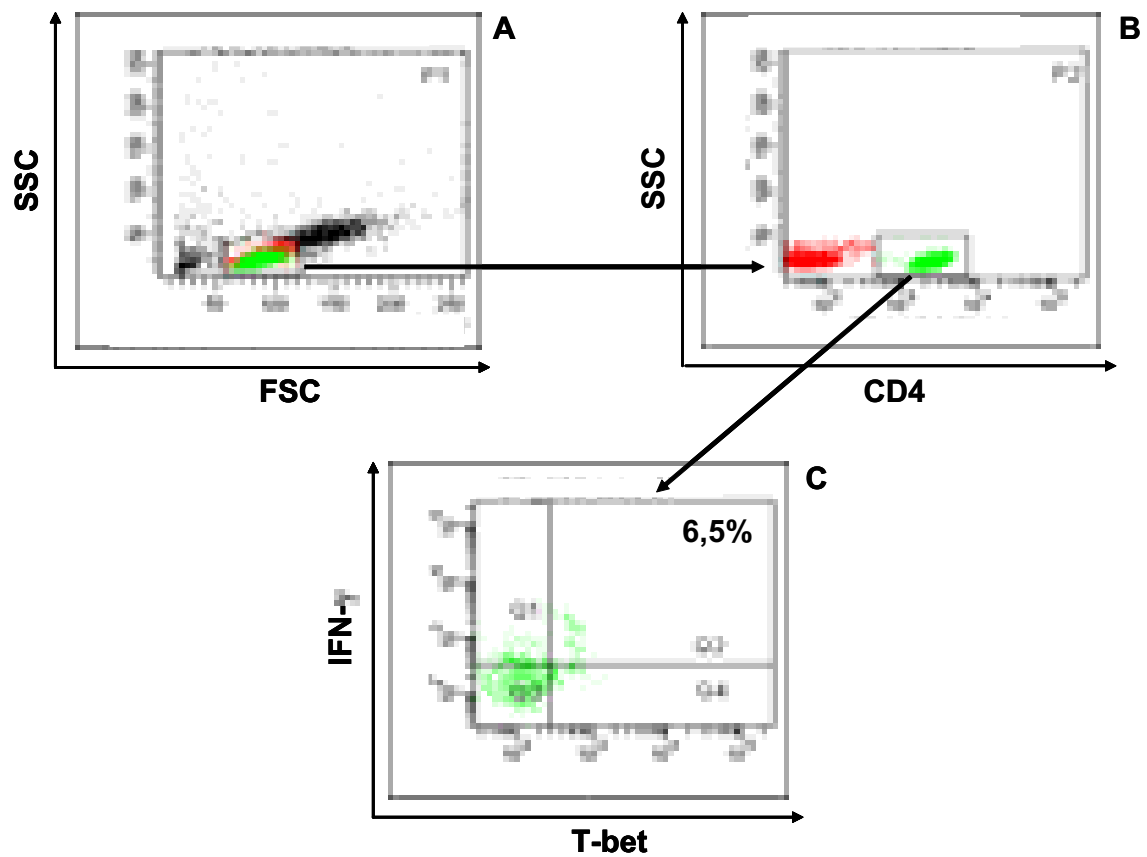


Figura 3. Exemplos de *Dot Plots* de citometria de fluxo representando a seleção de células TCD4⁺T-bet⁺IFN- γ ⁺. A, Seleção de linfócitos do sangue periférico de um dos pacientes com tuberculose após estímulo com rGLcB de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). B, Seleção da população de células TCD4⁺ de acordo com a fluorescência. C, Parâmetros utilizados para quantificação de células TCD4⁺T-bet⁺IFN- γ ⁺ de um dos pacientes com tuberculose, o qual apresentou 6,5% das células TCD4⁺ com o fenótipo pesquisado (Q2). As análises foram realizadas pelo software BD FACS DIVA.

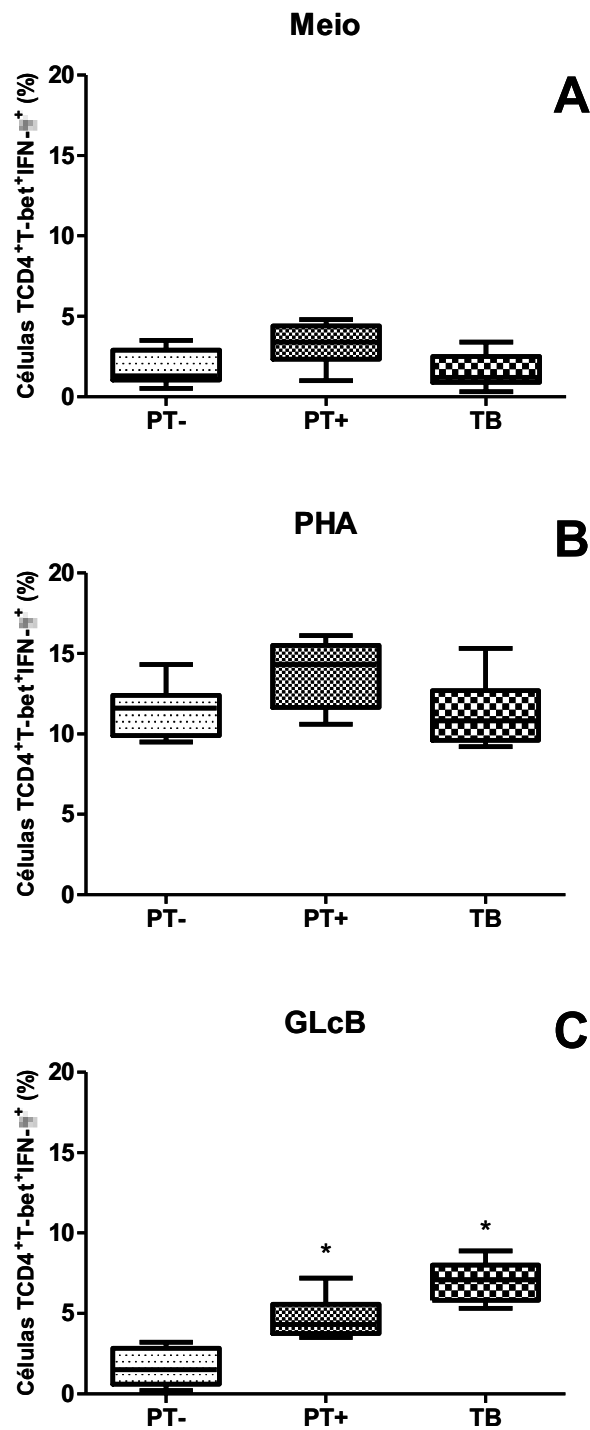


Figura 4. Porcentagens de células TCD4⁺T-bet⁺IFN- γ ⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+). Pacientes com TB apresentam maior porcentagem de células Th1 específicas. A, Análise das células cultivadas somente com Meio (controle negativo do teste). Análise das células estimuladas com PHA (controle positivo do teste). C, Análise das células estimuladas com rGLcB (estímulo específico). Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos. * Diferença significativa dos indivíduos PT+ (n=11) e dos pacientes com TB (n=21) comparados com os controles PT- (n=12) (p<0,05).

5.4 Análise de células Th17 IL-17+

Após seleção da população de linfócitos (Figura 5A) e destes as células $CD4^+$ (conforme descrito na seção anterior, Figura 5B), as células Th17 ($CD4^+IL-23R^+IL-17^+$) foram caracterizadas quanto à expressão do receptor da interleucina 23 (IL-23R) e avaliadas quanto a positividade para IL-17 (Figura 5C). Observou-se que pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentavam células Th17 específicas ao antígeno recombinante GLcB (Figura 6C) enquanto que as células dos indivíduos com tuberculose latente e dos controles saudáveis não responderam especificamente a este antígeno (Figura 6C).

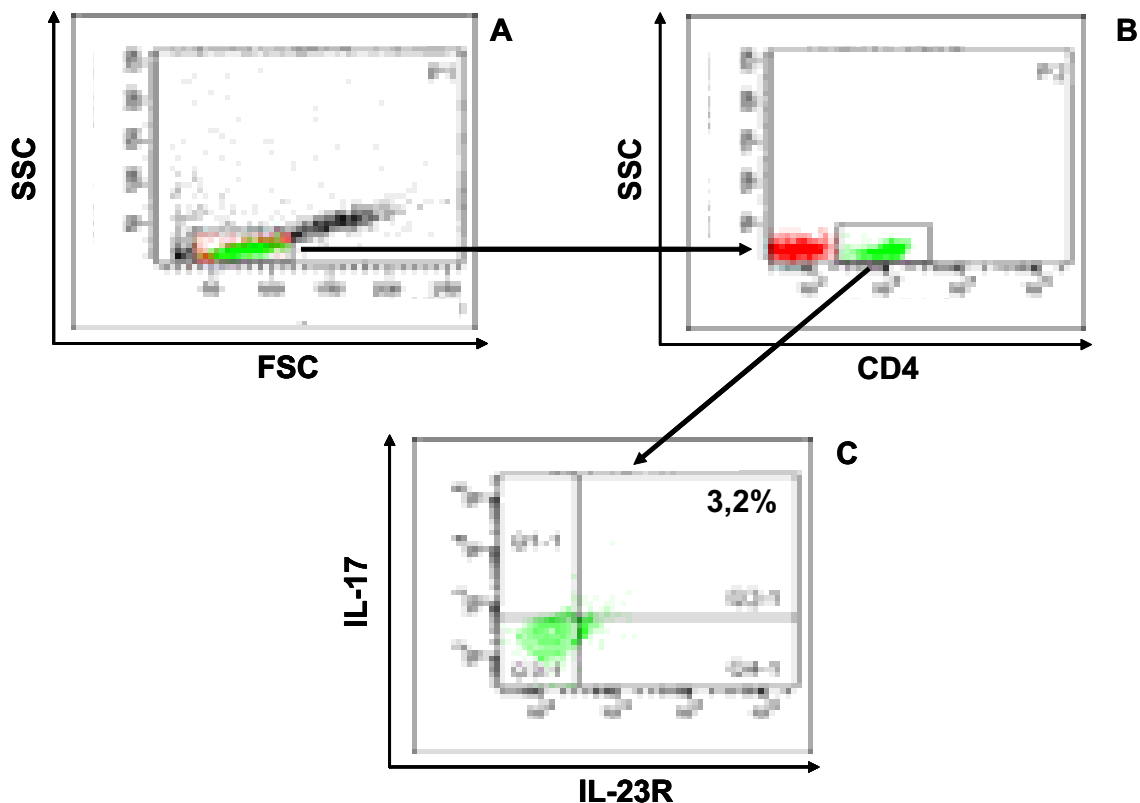


Figura 5. Exemplos de *Dot Plots* de citometria de fluxo representando a seleção de células $CD4^+IL-23R^+IL-17^+$. A, Seleção de células mononucleares do sangue periférico de um dos pacientes com tuberculose após estímulo com rGLcB de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). B, Seleção da população de células $CD4^+$ de acordo com a fluorescência. C, Parâmetros utilizados para quantificação de células $CD4^+IL-23R^+IL-17^+$ de um dos pacientes com tuberculose, o qual apresentou 3,2% das células $CD4^+$ com o fenótipo pesquisado (Q2-1). As análises foram realizadas pelo software BD FACS DIVA.

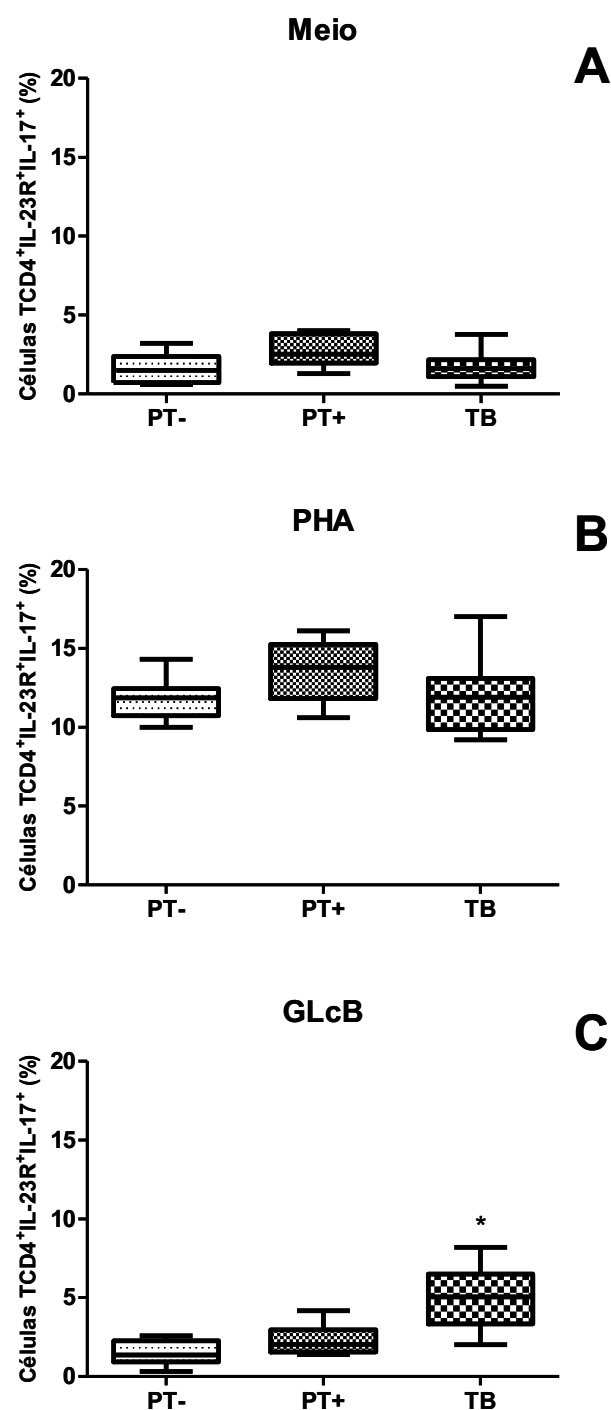


Figura 6. Porcentagens de células TCD4⁺IL-23R⁺IL-17⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+). Pacientes com TB apresentam maior porcentagem de células Th17 específicas. A, Análise das células cultivadas somente com Meio (controle negativo do teste). Análise das células estimuladas com PHA (controle positivo do teste). C, Análise das células estimuladas com rGLcB (estímulo específico). Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos. * Diferença significativa dos pacientes com TB (n=21) comparados com os indivíduos PT+ (n=11) e controles PT- (n=12) (p<0,05).

5.5 Análise de células T reguladoras

Para avaliar a presença das células T reguladoras, as PBMC obtidas de todos os grupos foram concentradas e fixadas em lâminas de vidro com acetona e em seguida foi realizada imunocitoquímica, onde as células foram marcadas com anticorpos monoclonais que caracterizam células T reguladoras (anti-CD4, anti-CD25 e anti-FOXP3). Observou-se que tanto os pacientes com tuberculose ativa e latente quanto os controles saudáveis apresentam células expressando os marcadores analisados (Figura 7) indicando que há a presença de células reguladoras no sangue periférico destes indivíduos.

Após constatar a presença de células T reguladoras, as mesmas foram quantificadas pela técnica de citometria de fluxo. Após seleção da população de linfócitos (Figura 8A) e destes as células CD4⁺ (conforme descrito anteriormente, Figura 8B), avaliou-se as células T reguladoras (Treg), que foram caracterizadas pela expressão do CD25 (cadeia α do receptor da IL-2) e do fator de transcrição FOXP3 (indutor da diferenciação de células T reguladoras) (Figura 8C).

Notou-se que tanto indivíduos com tuberculose ativa como latente possuem porcentagem (Figura 9A) e número total (Figura 9B) de células T reguladoras específicas ao antígeno recombinante GLcB aumentadas quando comparadas ao controle ($p < 0,05$).

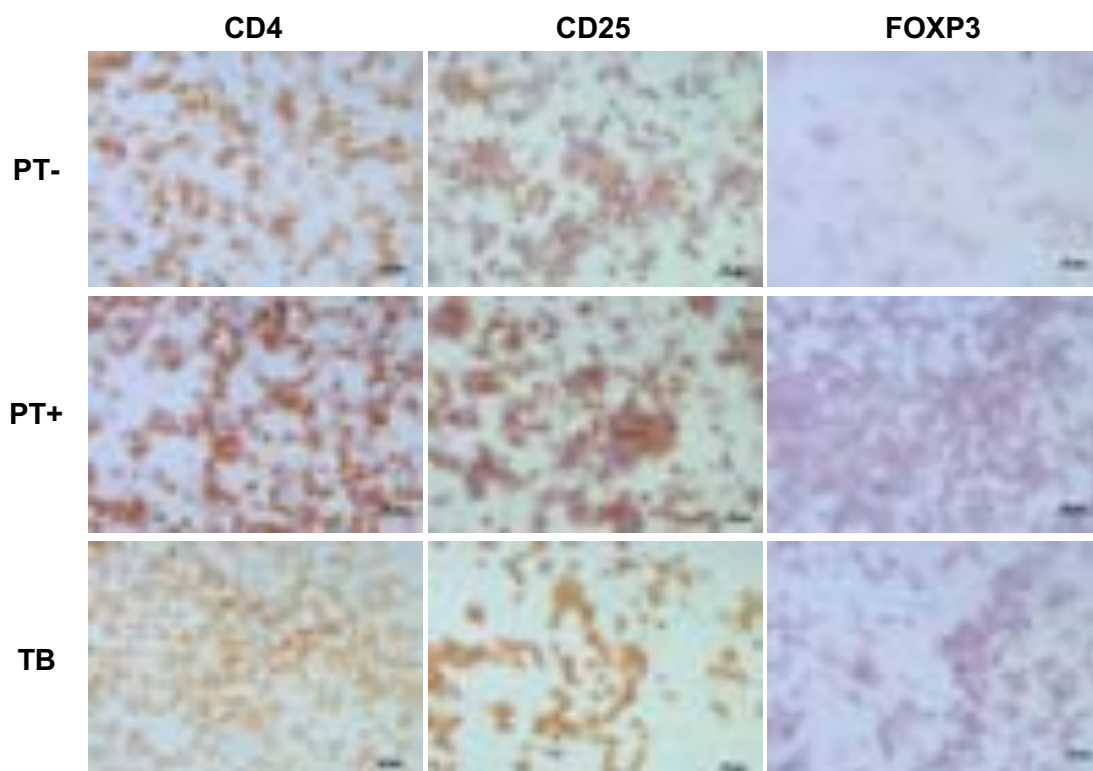


Figura 7. Presença de células expressando marcadores de células T reguladoras no sangue periférico de pacientes com tuberculose e indivíduos saudáveis. PBMC foram obtidas dos indivíduos em estudo, fixadas em lâminas e marcadas com anticorpos monoclonais específicos para CD4, CD25 e FOXP3. Imunocitoquímica, aumento original de 20x.

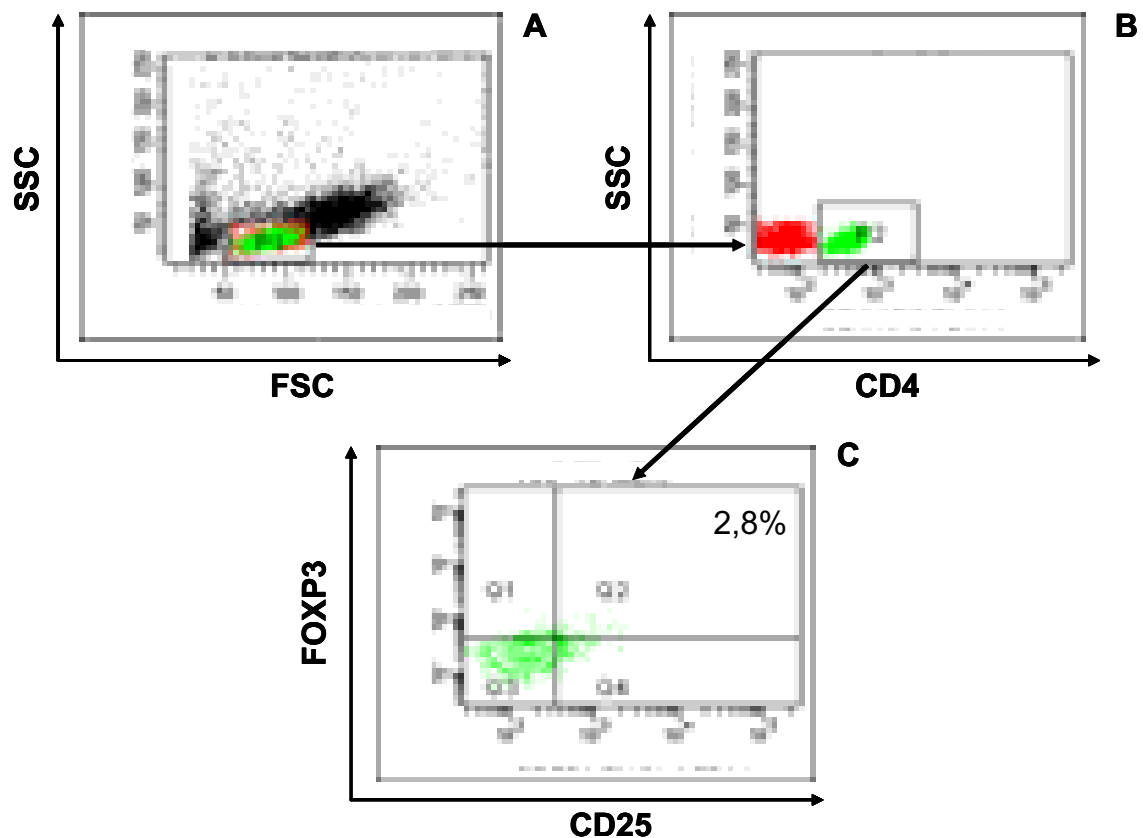


Figura 8. Exemplos de *Dot Plots* de citometria de fluxo representando a seleção de células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. A, Seleção de linfócitos do sangue periférico de um dos pacientes com tuberculose após estímulo com rGLcB de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). B, Seleção da população de células TCD4⁺ de acordo com a fluorescência. C, Parâmetros utilizados para quantificação de células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ de um dos pacientes com tuberculose, o qual apresentou 2,8% das células TCD4⁺ com o fenótipo pesquisado (Q2). As análises foram realizadas pelo software BD FACS DIVA.

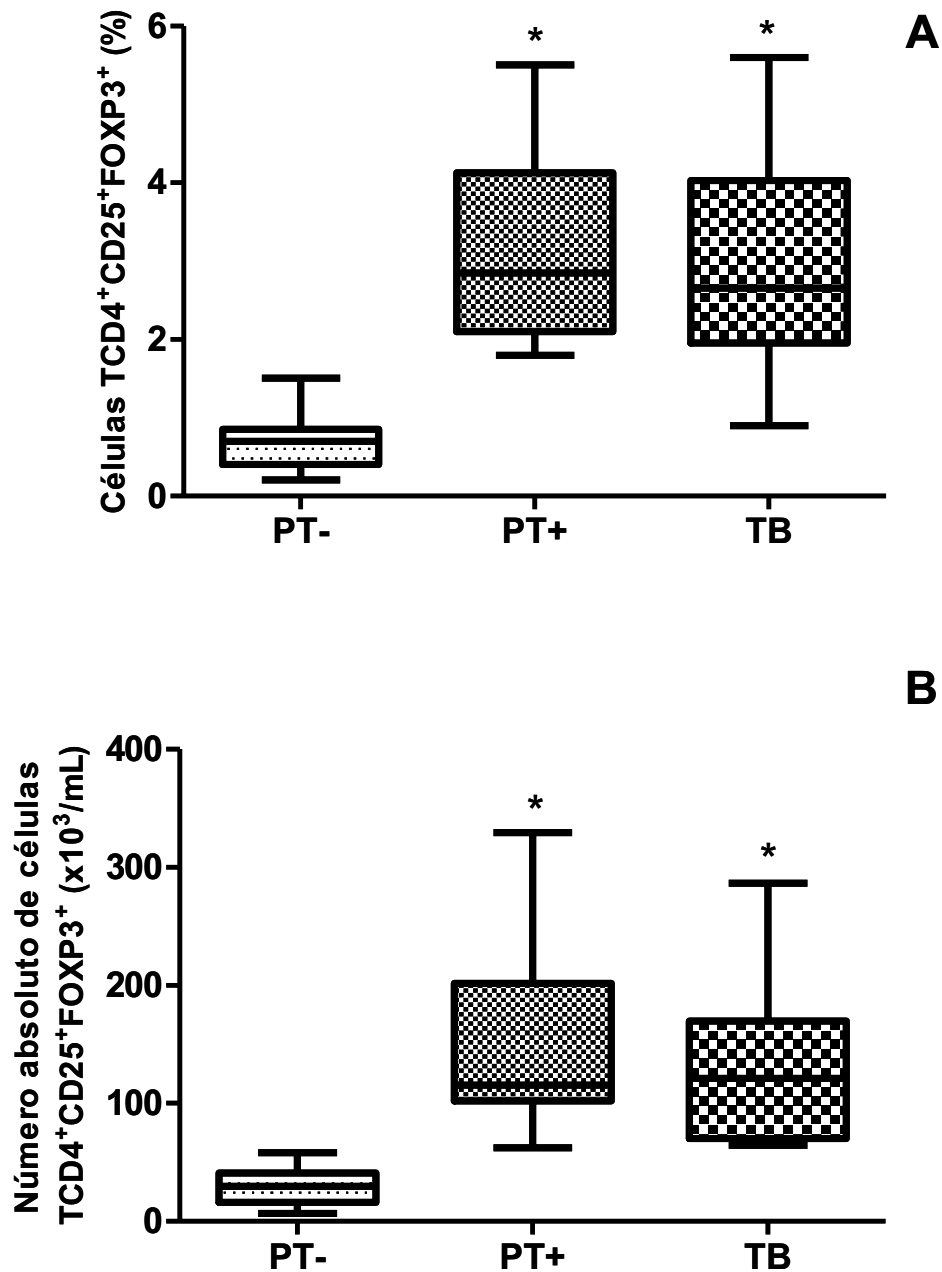


Figura 9. Porcentagens de células T reguladoras (TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) específicas ao antígeno GLcB de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+). Pacientes com TB apresentam maior porcentagem de células Treg específicas. A, Análise da porcentagem de células Treg dos grupos analisados. B, Análise do número absoluto de células Treg no sangue periférico dos grupos avaliados. Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos. * Diferença significativa dos indivíduos PT+ (n=11) e dos pacientes com TB (n=21) comparados com os controles PT- (n=12) (p<0,05).

5.6 Análise de células T reguladoras TGF- β ⁺

Após a seleção das células Treg de acordo com os parâmetros descritos anteriormente, as células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ foram selecionadas e analisadas quanto à positividade para TGF- β (Figura 10A). Observou-se que somente os pacientes com tuberculose pulmonar ativa apresentam células Treg TGF- β ⁺ específicas para o antígeno recombinante GLcB comparados com indivíduos com TB latente e com os controles saudáveis (Figura 10B) ($p < 0,05$).

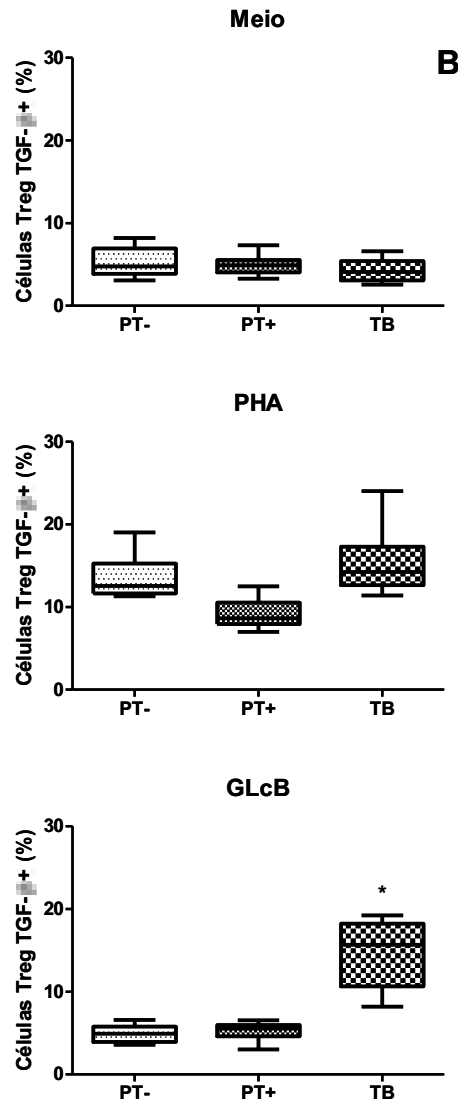
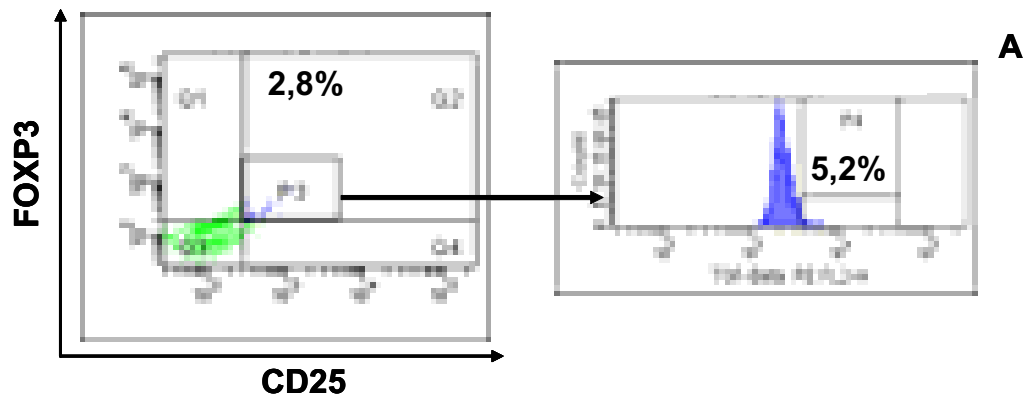


Figura 10. Porcentagens de células Treg TGF- β 1+ (TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ TGF- β 1⁺) de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+). Pacientes com TB apresentam maior porcentagem de células Treg TGF- β 1+ específicas. A, Exemplos de *Dot Plots* da análise das células Treg TGF- β 1+, onde foi feita uma seleção nas células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e estas foram avaliadas quanto à positividade para TGF- β 1. B, Análise das células Treg TGF- β 1+ de todos os grupos estudados (Meio=controle negativo, PHA=controle positivo, GLcB= estímulo específico). Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos. * Diferença significativa dos pacientes com TB (n=21) comparados com os indivíduos PT+ (n=11) e controles PT- (n=12) (p<0,05).

5.7 Análise de células T reguladoras IL-10⁺

De acordo com os mesmos parâmetros descritos na seção anterior, foi analisada também a positividade das células T reg selecionadas quanto a IL-10 (Figura 11A). Não houve diferença significativa na porcentagem de células Treg IL-10⁺ específicas ao antígeno recombinante GLcB quando comparou-se os grupos estudados (Figura 11B).

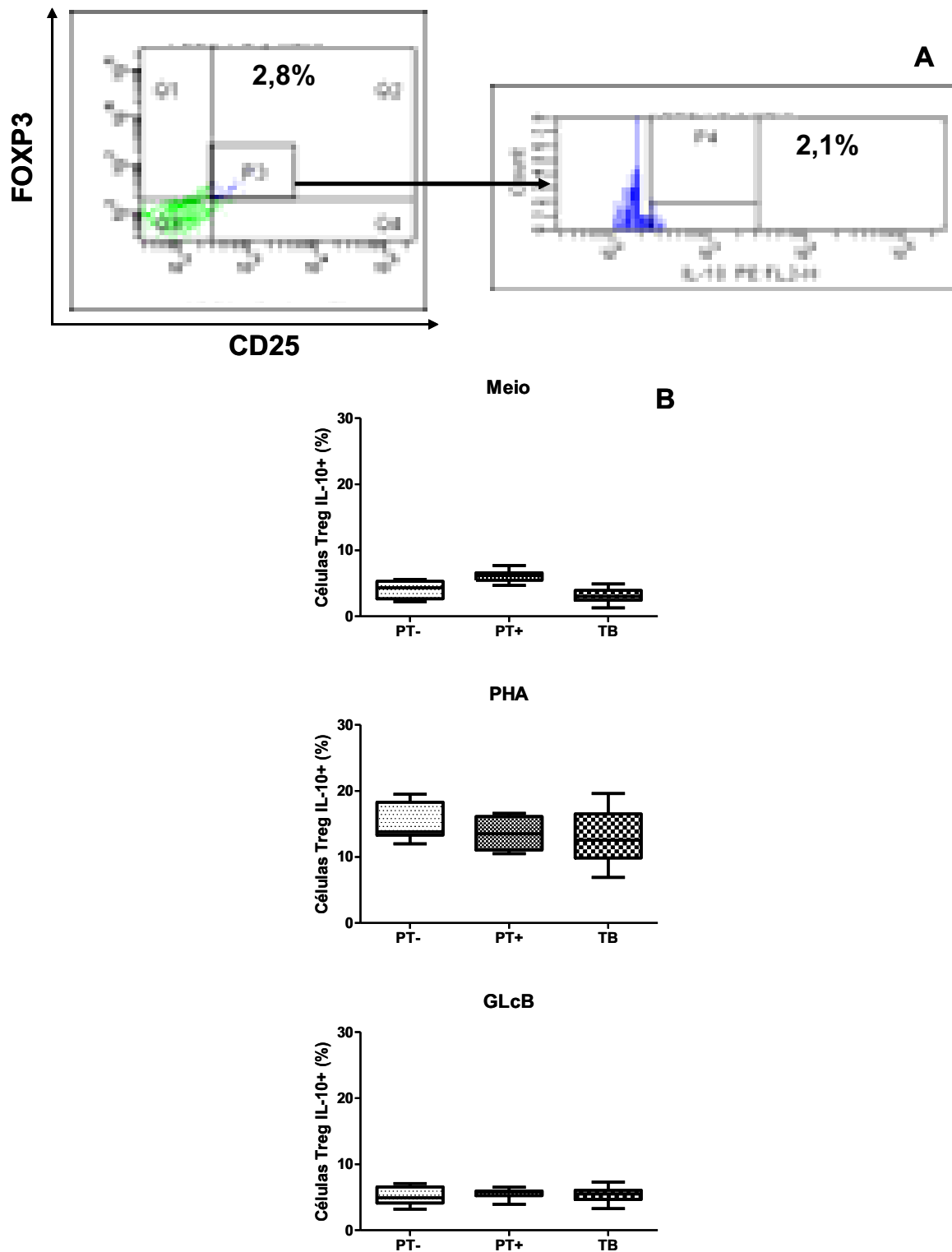


Figura 11. Porcentagens de células Treg IL-10⁺ (TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺) de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB) e controles saudáveis (PT- e PT+). Não houve diferença significativa na porcentagem de células Treg IL-10⁺ específicas ao antígeno rGLcB nos grupos estudados. A, Exemplos de *Dot Plots* da análise das células Treg IL-10⁺, onde foi feita uma seleção nas células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e estas foram avaliadas quanto a positividade para IL-10. B, Análise das células Treg IL-10⁺ de todos os grupos estudados (Meio=controle negativo, PHA= controle positivo, GLcB= estímulo específico). Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos.

5.8 Análise das células de pacientes com alto risco de desenvolvimento de tuberculose ativa

O constante tratamento com antiinflamatórios e drogas anti-TNF- α aos quais os pacientes com AR são submetidos, propicia a uma maior susceptibilidade de reativação da TB e consequentemente favorece a progressão da doença. Diante disso, a avaliação da resposta imune destes pacientes beneficiaria o entendimento do desenvolvimento da TB ativa. Portanto, células Th1, Th17 e T reguladoras de pacientes com AR e daqueles pacientes que apresentam AR e que desenvolveram TB (TBAR) foram analisadas por citometria de fluxo conforme já descrito neste trabalho. Os resultados mostrados anteriormente para pacientes com tuberculose ativa foram confirmados através da análise das subpopulações de células TCD4⁺ Th1, Th17 e T reguladoras do grupo de pacientes com TBAR.

Não houve diferença significativa na análise de todas as subpopulações aqui estudadas de pacientes com AR PT⁺ quando comparado aos pacientes com AR PT⁻. Portanto, o grupo de pacientes com AR constitui tanto os pacientes PT⁺ quanto os PT⁻. A análise das células TCD4⁺ demonstrou que pacientes com TBAR apresentam maior número de células, quando comparado com os pacientes com AR (Figura 12B). Não observou-se diferença na porcentagem dessas células quando comparamos os dois grupos (Figura 12A).

Pacientes com TBAR apresentaram índices semelhantes aos pacientes com AR, de células Th1 específicas ao antígeno rGLcB (Figura 12C). Porém, a presença de tuberculose ativa nos pacientes com AR, induziu o aumento da porcentagem de células Th17 (Figura 12D), porcentagem e número absoluto de T reguladoras (Figura 12E e 11F) e Treg TGF- β ⁺ (Figura 12G) específicas ao antígeno rGLcB quando comparados aos pacientes com AR. Não houve diferença significativa na porcentagem de células Treg IL-10⁺ (Figura 12H).

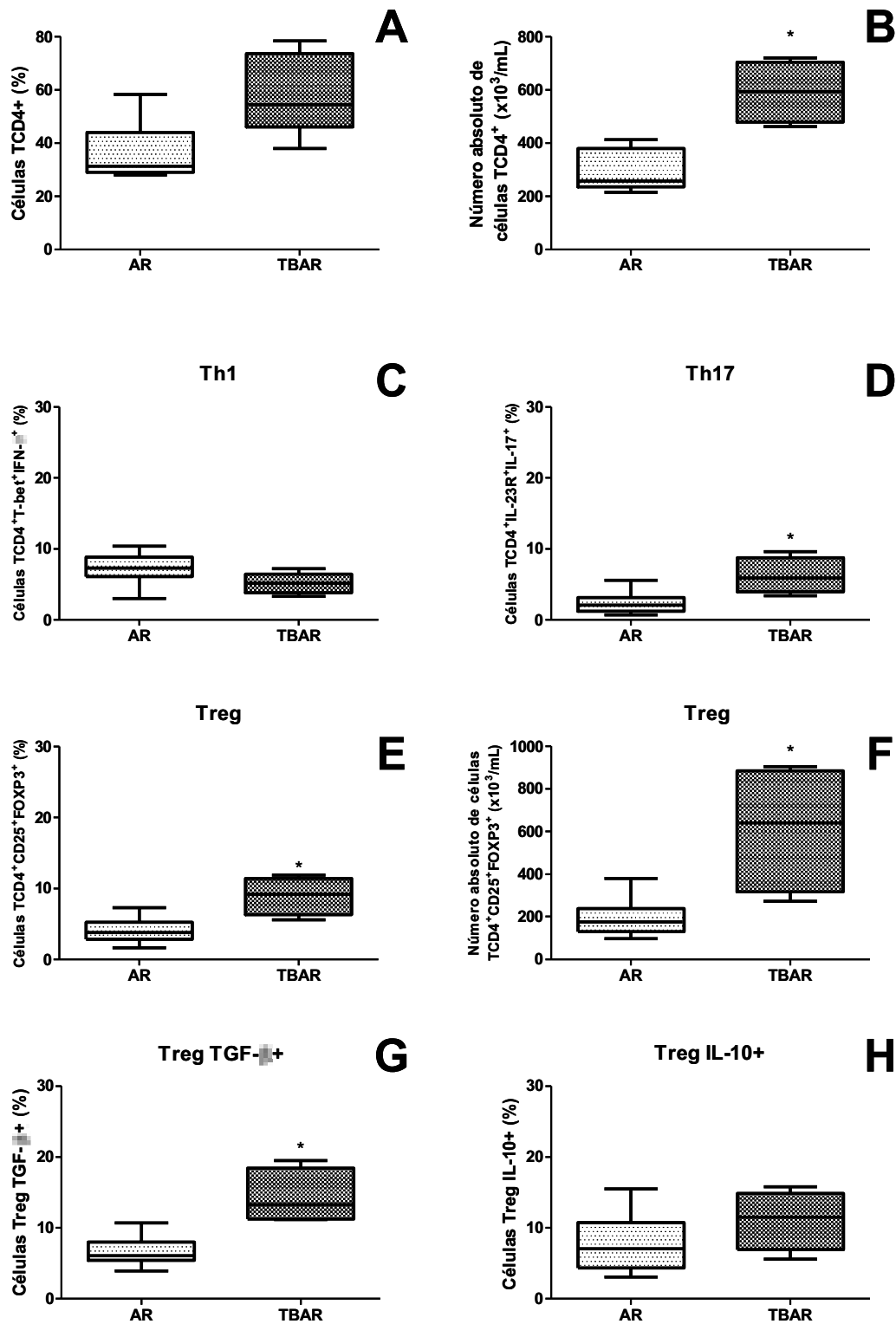


Figura 12. Análise das células de paciente com AR e TBAR. A, Porcentagens de células TCD4⁺. B, Número absoluto de células TCD4⁺. C, Porcentagens de células TCD4⁺T-bet⁺IFN- γ ⁺. D, Porcentagens de células TCD4⁺IL-23R⁺IL-17⁺. E, Porcentagens de células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. F, Número absoluto de células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. G, Porcentagens de células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺TGF- β ⁺. H, Porcentagens de células TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺. Os resultados representam a mediana (barra central), o desvio padrão (barras superiores e inferiores) e amplitude de variação (limites superior e inferior do quadrado) de cada um dos grupos. * Diferença significativa dos pacientes com TBAR (n=3) comparados com os pacientes com AR (n=22) (p<0,05).

5.9 Ensaio Funcional

Para avaliar o papel das células T reguladoras na tuberculose, PBMCs autólogas marcadas com CFSE de pacientes com TB foram co-cultivadas com células Treg purificadas através da separação com esferas magnéticas e previamente estimuladas com anti-CD3 e rGLcB. Foi avaliada a proliferação das PBMCs co-cultivadas com células Treg a partir da seleção de células marcadas com CFSE. Observou-se que células co-cultivadas com Treg autólogas reduzem a sua proliferação (Figura 13B) quando comparadas com as células cultivadas sem Treg (Figura 13A). Essa inibição da proliferação é específica, uma vez que as células foram cultivadas com o antígeno rGLcB, mostrando a especificidade da regulação.

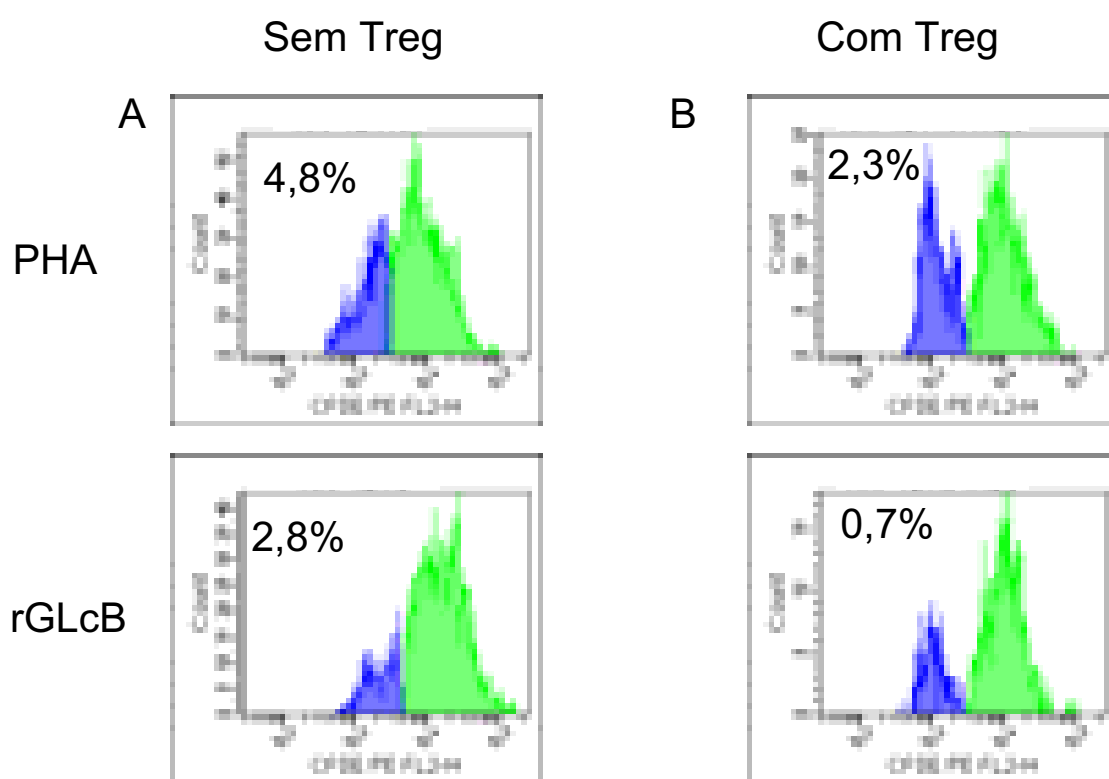


Figura 13. Inibição da proliferação de células autólogas em pacientes com TB por células Treg. Co-cultura de células Treg purificadas através de esferas magnéticas cultivadas com PBMC autólogo de pacientes com TB (n=3). A, Células cultivadas na ausência de Treg com e sem estímulo específico (rGLcB). B, Células cultivadas na presença de Treg com e sem estímulo específico (rGLcB). A parte azul do gráfico representa a porcentagem das células que tiveram a sua proliferação inibida.

6. DISCUSSÃO

A análise do perfil sócio-epidemiológico dos participantes deste estudo demonstrou que a maioria dos pacientes com TB era do sexo masculino e com a faixa etária média adulta em fase de reprodução. Isto também é observado nos pacientes com AR, porém a maioria deles era do sexo feminino. A análise das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (TB e TBAR) demonstrou a existência de um número significativo de células TCD4⁺ específicas para o antígeno recombinante GLcB do *M. tuberculosis*. Dentro desta população, a porcentagem das subpopulações celulares Th1, Th17 e Treg TGF- β ⁺ específicas encontraram-se aumentadas no sangue periférico destes mesmos indivíduos. Já os indivíduos com tuberculose latente (PT+) apresentaram somente células Th1 específicas em níveis mais elevados que os controles saudáveis.

No estudo de corte transversal, observou-se que 61.9% dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa eram do sexo masculino (n=13), constituindo a maioria dentro do grupo de estudo, uma vez que somente 38% eram do sexo feminino (n=8). A vida social dos homens nos países em desenvolvimento é mais livre e mais dinâmica do que a das mulheres, propiciando a este sexo uma maior chance de infecção com o bacilo da TB. De acordo com a OMS, na maior parte do mundo, a maioria dos indivíduos diagnosticados com TB é do sexo masculino e estes morrem mais por esta doença se comparados com o sexo feminino (WHO 2009). Quanto à faixa etária destes indivíduos, a média de idade foi de 41.9 anos, variando de 23 a 60 anos de idade. A tuberculose é uma doença que afeta a população de indivíduos adultos em fase reprodutiva e estes dados refletem, portanto, o que ocorre no Brasil e no mundo, uma vez que o país constitui uma região endêmica para a doença (WHO 2009). Além disso, estes achados estão de acordo com Almeida et al (2008) e Araújo-Filho et al (2008) que encontraram médias de idade (42 e 39.7, respectivamente) e variação média em anos (20-74 e 22-74 respectivamente) semelhante em seus grupos de pacientes com tuberculose pulmonar (Almeida et al. 2008; Araújo-Filho et al. 2008). Vale ressaltar que os três estudos foram realizados na mesma região do país, o Estado de Goiás, justificando assim tamanha coincidência.

Ao analisar os indivíduos com artrite reumatóide, observou-se que 90,9% dos pacientes eram do sexo feminino (n=20), constituindo a maioria dentro do grupo estudado. A média de idade dos pacientes com AR foi de 51 anos, variando de 21 a 75 anos. Neste estudo, é muito interessante notar que somente três dos indivíduos com AR desenvolveram tuberculose ativa (12%) e nossos achados estão de acordo com a OMS, que afirma que aproximadamente 5-10% dos indivíduos com infecção latente sofrem reativação para doença ativa durante a vida (WHO 2009). Todos os pacientes que desenvolveram tuberculose pulmonar ativa eram do sexo feminino, o que era esperado uma vez que formavam a maioria dentro deste grupo. A OMS afirma que a AR afeta duas vezes mais mulheres do que homens em decorrência de fatores genéticos ainda não totalmente elucidados e a sua incidência aumenta com a idade (WHO 2008).

Durante a avaliação dos pacientes que receberam a vacina profilática durante a infância, 14 indivíduos com tuberculose pulmonar ativa e 16 pacientes com AR foram vacinados com BCG na

infância enquanto sete pacientes com TB e 09 pacientes com AR não foram vacinados ou não souberam informar sobre a vacinação e nem apresentavam cicatriz vacinal. Atualmente, a eficácia da proteção induzida pela BCG contra TB tem sido muito questionada (Abou-Zeid et al. 1987; Kaufman 2004). Apesar de não induzir proteção contra a TB em indivíduos adultos, a BCG oferece proteção acima de 50% contra TB infantil e meningites tuberculosas (Andersen 2007). Em decorrência disto, novas vacinas estão sendo extensamente pesquisadas no intuito de melhorar a eficácia do BCG ou mesmo substituí-la (Derrick et al. 2004; Franco et al, 2008; Vasconcelos-Júnior et al. 2009).

Embora aspectos críticos da tuberculose em humanos tenham sido estudados, a resposta imune durante a evolução para doença ativa é um assunto em debate. Nesse estudo nós avaliamos subpopulações de células TCD4⁺ e correlacionamos com o *status* da doença ativa. Pacientes com TB pulmonar ativa (TB e TBAR) apresentaram maior número de células TCD4⁺ no sangue periférico quando comparado com os indivíduos com tuberculose latente e com os controles saudáveis. Nossos resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Barcelos et al. (2006) e Light et al. (2002) que também encontraram aumento dos níveis de células TCD4⁺ em pacientes com tuberculose, independente do *status* clínico da doença comparados aos controles saudáveis (Light et al. 2002; Barcelos et al. 2006). Porém, a tuberculose ativa já foi associada com redução de linfócitos TCD4⁺ no sangue periférico, o que pode ser explicado pela migração dos linfócitos para o sítio de infecção (pulmão) (Beck et al. 1985). Além disso, linfócitos TCD4⁺ e suas citocinas são componentes críticos na imunidade protetora contra *M. tuberculosis* (Flynn & Chan 2001). Já os pacientes com AR não mostraram aumento dos níveis periféricos de células TCD4⁺, concordando com os achados descritos por Fekete et al (2007) e Berner et al (2000) que analisaram a porcentagem de células TCD4⁺ de PBMC de pacientes com AR e observaram que estes pacientes apresentam níveis semelhantes destas células aos controles saudáveis (Fekete et al. 2007; Berner et al. 2000).

A avaliação das células Th1 demonstrou que indivíduos com TB ativa e latente apresentam uma resposta específica ao antígeno rGLcB do *M. tuberculosis* com produção de IFN- γ . A resposta imune Th1 é efetiva e protetora contra infecções causadas por microrganismos intracelulares como o *M. tuberculosis* e é caracterizada pela produção de citocinas como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Takashima et al. 1990; Schluger 2001; Salgame 2005). A importância da produção de IFN- γ por células TCD4⁺ na tuberculose tem sido bem demonstrada, onde camundongos KO (*knockout*) para IFN- γ e humanos com defeito no receptor para IFN- γ são mais susceptíveis à infecção por TB (Cooper et al. 1993; Flynn et al. 1993; Newport et al. 1996). Nosso grupo demonstrou previamente que células de pacientes com TB reconhecem vários antígenos de *M. tuberculosis* principalmente através de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ (Araújo-Filho et al. 2008). No presente estudo nós demonstramos novamente que indivíduos com TB ativa e latente induzem uma resposta imune específica com produção de IFN- γ . Além disso, nós classificamos estas células como T-bet⁺, confirmando o seu fenótipo Th1 (Wallet et al. 2010). Estes resultados sugerem que antígenos de *M. tuberculosis* são capazes de

induzir a diferenciação de células Th0 em um fenótipo Th1, embora estas células Th1 nem sempre induzam proteção contra TB.

Apesar de somente quatro pacientes com AR apresentarem PT+, surpreendentemente, os pacientes com AR (independente da PT) apresentaram resposta imune Th1 específica ao antígeno rGLcB semelhante aos indivíduos com infecção latente. Uma vez que a prova tuberculínica têm sido descrita como um teste não apropriado para identificação de infecção latente em indivíduos com AR (León et al. 2005), tais achados podem indicar possível infecção latente em pacientes com AR que foram caracterizados como PT-. Recentes estudos têm descrito a dificuldade em diagnosticar TB latente em indivíduos com AR (Tannus-Silva et al, 2010) e sugerem que a dosagem de IFN- γ da cultura de leucócitos do sangue como um melhor teste para identificar indivíduos com infecção latente (Desem & Jones 1998; Efthimiou & Sood 2007; Marques et al. 2009). Além disso, o antígeno utilizado na PT (Derivado Protéico Purificado – PPD) não é específico para *M. tuberculosis* e como o Brasil é um país endêmico para outras micobactérias, como o *M. leprae*, o teste é passível de interpretações erradas em decorrência da reação cruzada que pode ocorrer com outros antígenos micobacterianos (Desem & Jones 1998). Em adição, os pacientes com AR apresentam uma inabilidade em produzir uma adequada resposta ao PPD, em decorrência de um defeito na função imune celular destes pacientes (Panayi et al. 2001; Kraan et al. 2000) e o longo tratamento dos pacientes com AR com drogas antiinflamatórias (mais de dez anos) pode reduzir a capacidade de migração das células em resposta ao PPD (Matulis et al, 2008; Kraan et al. 2000).

Além das células Th1, analisamos as células Th17 e observamos que somente os pacientes com TB pulmonar ativa (TB e TBAR) induzem uma resposta Th17 específica ao rGLcB, com positividade para IL-17. Além das citocinas classicamente descritas na TB, outras descobertas mais recentemente estão sendo investigadas nessa patologia. Uma nova subpopulação de células T que produzem interleucina-17 (IL-17) tem sido caracterizada na TB (Lenarczyk et al. 2000; Harrington et al. 2006; Mangan et al. 2006), porém é a primeira vez que é investigada uma população celular classicamente caracterizada como Th17, uma vez que neste estudo, estas foram caracterizadas somente quando expressavam ao mesmo tempo o receptor para IL-23 e produziam IL-17. Estudos recentes têm sugerido que linfócitos T auxiliares produtores de IL-17 estão ativados durante a TB, embora o seu papel não esteja totalmente claro nesta doença. A eliminação de células Th17 em camundongos leva a uma redução da acumulação de células TCD4⁺IFN- γ ⁺ no pulmão e diminuem a proteção em um modelo de vacina, indicando o papel crucial destas células na patogênese da TB (Khader et al. 2007). É provável que estas células representem a primeira linha de defesa contra o *M. tuberculosis* e participem dos estágios iniciais de formação do granuloma através do recrutamento de neutrófilos para a lesão primária (Ouyang et al. 2008).

O presente estudo encontrou que células Th17 específicas foram correlacionadas com a fase ativa da TB, tanto nos paciente com TB ativa quanto nos pacientes com AR que desenvolveram a

doença ativa, uma vez que tanto os indivíduos com infecção latente quanto os pacientes com AR não mostraram aumento na porcentagem destas células específicas. Foi demonstrado previamente que a porcentagem de células Th17 e suas citocinas são menores em pacientes com TB ativa quando comparadas com doadores saudáveis e indivíduos com infecção latente (Curtis & Way 2009; Babu et al. 2010), mas estes estudos, não avaliam células Th17 específicas à antígenos do *M. tuberculosis* em pacientes de uma região endêmica rica em micobactérias ambientais como o Brasil, além disso, nenhum destes estudos demonstrou o papel dessa subpopulação em pacientes com TBAR.

Uma outra subpopulação de células TCD4⁺ que vem sendo amplamente estudada é a de células T reguladoras, das quais a sua participação efetiva na tuberculose ainda vêm sendo desvendada. Estudos realizados previamente por nosso grupo demonstraram um forte indicativo de que haveria outras subpopulações celulares TCD4⁺ produtoras de IL-10 que poderiam estar envolvidas na patogênese da doença (Araújo-Filho et al. 2008). Uma vez que as células Treg têm sido descritas como células produtoras de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, analisamos as células Treg dos indivíduos incluídos neste estudo. Os resultados aqui apresentados demonstraram que indivíduos com TB ativa e latente têm níveis aumentados de células Treg (TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) no sangue periférico e concordam com outros dados já descritos na literatura (Chen et al. 2007; Roberts et al. 2007; Chiacchio et al. 2009). Estudos recentes têm indicado que as células Treg CD4⁺CD25^{high} podem ser ativadas e expandidas durante a estimulação com bactérias, parasitas e antígenos virais *in vivo* (Belkaid et al. 2002; Hougardy et al. 2007a). Isto implica que células TCD4⁺CD25⁺ podem prevenir a imunopatologia induzida por um patógeno, mas podem também aumentar a carga de infecção e prolongar a persistência do patógeno suprimindo respostas imunes. Um equilíbrio entre os mecanismos reguladores e efetores podem determinar o resultado de uma infecção, e em alguns casos, isso pode ser benéfico para o hospedeiro e para o patógeno (Shevach 2002).

Nos resultados observados aqui, há um aumento dos níveis de células Treg TGF-β⁺ somente em pacientes com TB ativa (TB e TBAR) enquanto os níveis de células Treg IL-10⁺ permanecem semelhantes aos dos indivíduos com tuberculose latente e aos controles saudáveis. A superprodução de citocinas imunossupressoras como a IL-10 e TGF-β por células Treg tem sido relatada por Sakaguchi (2005) e O'Garra & Vieira (2004), embora sua função na TB humana não seja bem compreendida (O'Garra & Vieira 2004; Sakaguchi 2005). Já foi sugerido que o aumento de IL-10 e consequentemente de células Treg podem estar associados ao desenvolvimento da tuberculose ativa (Boussiotis et al. 2000). TGF-β também pode ter um papel no aumento da susceptibilidade devido a indução de apoptose de células T produtoras de IFN-γ de pacientes com TB (Hirsch et al. 1999; Hirsch et al 2001). Roberts et al. (2007) demonstraram que a imunossupressão durante a tuberculose ativa é caracterizada por aumento da expressão de mRNA de TGF-β (Roberts et al. 2007), que está de acordo com a nossa constatação de que a tuberculose ativa aumentou os níveis de células Treg TGF-β⁺ no sangue periférico.

Os pacientes com AR (com ou sem TB) mostraram altos níveis de células Treg IL-10⁺ específicas ao rGLcB quando comparado com todos os outros grupos estudados. A patogênese da AR envolve baixa produção de IL-10 por células T no sangue periférico enquanto que no líquido sinovial destes pacientes uma alta porcentagem destas populações de células T são observadas (Berner et al. 2000; McInnes & Schett 2007). Têm sido recentemente mostrado que macrófagos de pacientes com AR estimulados com IFN- γ produzem citocinas pró-inflamatórias quando expostos a antígenos presentes no líquido sinovial, porém na ausência do IFN- γ há produção de IL-10 (Wallet et al. 2010). Quando avaliou-se a resposta imune específica, observou-se que as células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com AR também apresentaram produção de IFN- γ mesmo na presença de células Treg IL-10⁺, demonstrando que outros mecanismos podem estar envolvidos nessa doença.

Treg constituem um componente essencial da tolerância periférica através da supressão de células T auto-reativas e potencialmente na prevenção das doenças auto-imunes (Sakaguchi 2005). Recentes estudos têm indicado que as células Treg podem também contribuir para a modulação negativa da resposta imune anti-TB (Ribeiro-Rodrigues et al. 2006; Guyot-Revol et al. 2006). O mecanismo pelos quais as células Treg suprimem essas respostas, no entanto, permanece controverso. Isso pode envolver a produção de IL-10 ou TGF- β e requerer o contato direto célula-célula (O'Garra & Vieira 2004; Guyot-Revol et al. 2006). Muitos estudos têm demonstrado o papel imunossupressor das células Treg na TB (Ribeiro-Rodrigues et al. 2006; Li et al. 2007; Hougardy et al. 2007b; Chen et al. 2007), através da supressão de células Th1 evidenciada pela redução dos níveis de IFN- γ observados ou da inibição da proliferação celular. Porém, o nosso é o primeiro estudo a demonstrar que a supressão da proliferação de células TCD4⁺ por células Treg autólogas é antígeno-específica.

É muito interessante notar que, enquanto os níveis de indivíduos com infecção latente apresentaram aumento de células Treg no sangue quando comparado com os indivíduos saudáveis, os indivíduos com infecção latente não apresentaram um aumento significativo na proporção de células TCD4⁺ IL-10⁺ ou TGF- β ⁺, aumentando a possibilidade de que elas podem não ter sido ativadas no sangue periférico, contrariamente às células Treg de pacientes com tuberculose ativa. Em outras palavras, durante a tuberculose latente, os níveis de citocinas pró-inflamatórias como exemplificado pelos níveis de células Th17 foram baixas e, talvez, não exigem Treg atividade. Esta possibilidade poderia ser avaliada por um experimento *ex vivo*.

Em virtude dos resultados aqui apresentados, geramos uma hipótese que pode explicar a participação das subpopulações celulares Th1, Th17 e Treg na transição do estado latente da TB para a doença ativa, conforme sugerido por Lin & Flynn et al. (2010) (Figura 14). Uma vez que o hospedeiro é infectado com o *M. tuberculosis*, uma efetiva resposta imune específica Th1 é induzida. Essa resposta imune produz citocinas (IFN- γ , TNF- α) que são requeridas para a formação e manutenção do granuloma. Nesta situação, a razão entre macrófagos infectados e ativados é provavelmente constante em ordem de seqüestrar o patógeno no foco primário da infecção. O aumento dos níveis de cé-

lulas Th17 específicas, que pode ser explicado pela própria genética imunológica do indivíduo, causa um prejuízo e favorece a dissolução do granuloma, levando conseqüentemente à reativação da doença. A excessiva ativação de células Th17 recruta neutrófilos que destroem a integridade do granuloma devido a um estresse oxidativo, permitindo a disseminação dos bacilos. Devido aos elevados níveis de células Th1 e Th17 específicas durante a tuberculose ativa, células Treg são ativadas e geram TGF- β . Esta citocina pode modular reações inflamatórias nas membranas mucosas, evitando o dano pulmonar excessivo, porém o TGF- β produzido está indiretamente envolvido no desenvolvimento de células Th17 através da inibição de células Th1, que seriam efetivas na doença (Santarlaschi et al. 2009). Portanto, isto gera um mecanismo de realimentação positiva com maior indução de Th17 e maior disseminação da bactéria, mantendo, portanto o estado ativo da doença.

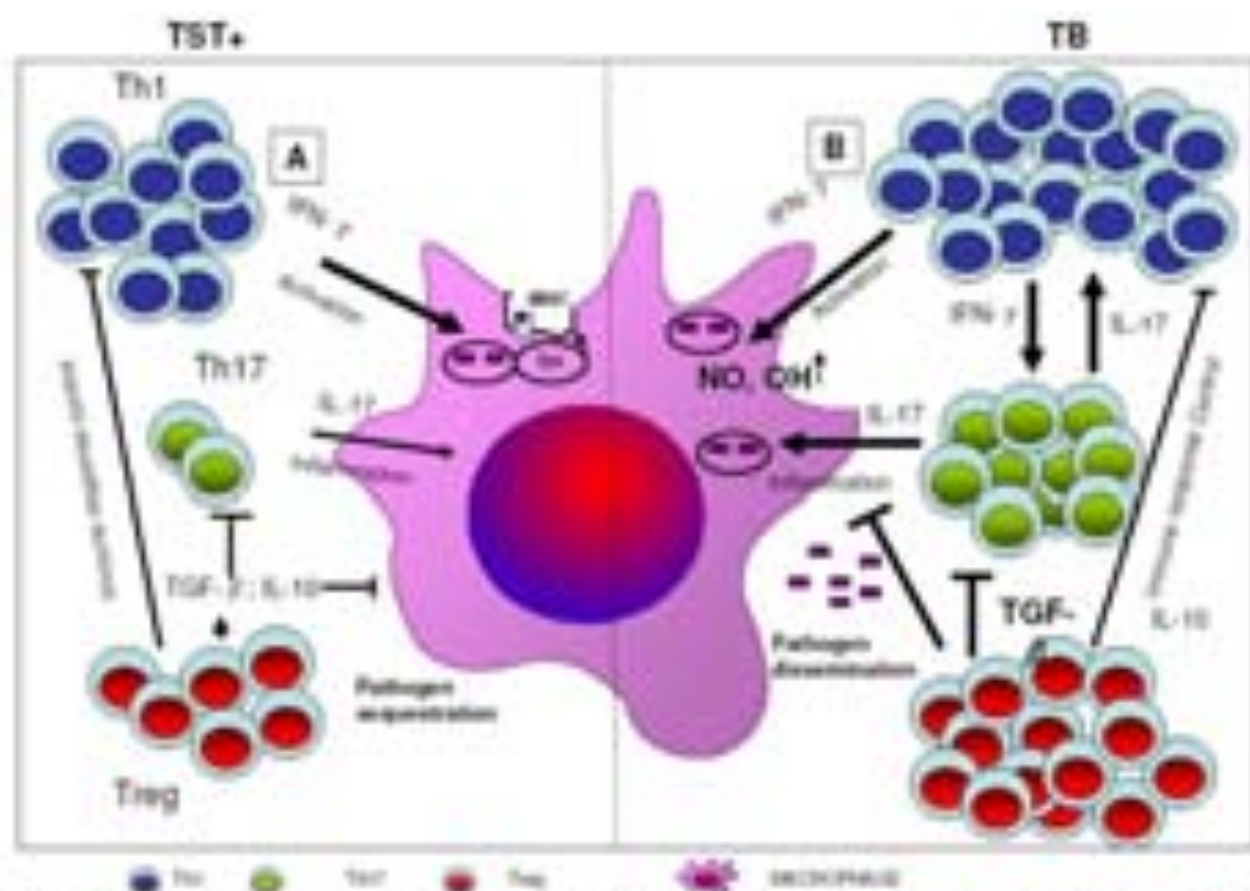


Figure 14: Esquema representativo da participação das subpopulações celulares Th1, Th17 e Treg na transição de estado imune na TB para doença ativa.

7. CONCLUSÕES

Pacientes com TB apresentam células com fenótipo Th1, Th17 e T reguladoras assim como os indivíduos com TB latente e os controles saudáveis.

A tuberculose ativa está relacionada com a participação de uma elevada porcentagem de células Th1, Th17 e T reguladoras TGF- β + específicas para o antígeno rGLcB do *M. tuberculosis*, enquanto que na TB latente há somente a influência de células Th1 específicas.

Não houve diferença na resposta imune das subpopulações de células Th1, Th17 e Treg de pacientes com AR PT+ e PT-, porém os pacientes com TBAR apresentaram resposta imune específica Th1, Th17 e Treg, o que não foi observado nos pacientes com AR.

A atividade das células Th1, Th17 e Treg em pacientes com tuberculose ativa (TB e TBAR) foi semelhante, confirmando o envolvimento dessas células na doença ativa.

A função das células T reguladoras na TB está relacionada com a supressão da proliferação de outras células específicas na resposta imune ao *M. tuberculosis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarvak T, Chabaud M, Kallberg E, Miossec P, Natvig J B 1999. Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium. *Scand. J. Immunol.* 50: 1-9.
- Aarvak T, Natvig J B 2001. Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 3: 13-17.
- Abou-Zeid C, Rook G A W, Minnikin D E, Osbornt T W, Grangets J M 1987. Effect of the method of preparation of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine on the properties of four daughter strains. *Journal of Applied Bacteriology.* 63: 449-453.
- Achkar J M, Dong Y, Holzman R S, Belisle J, Kourbeti I S, Sherpa T, Condos R, Rom W N, Laal S 2006. *Mycobacterium tuberculosis* Malate Synthase- and MPT51-Based Serodiagnostic Assay as an Adjunct to Rapid Identification of Pulmonary Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology.* 13: 1556-1568.
- Aderem A, Underhill D M 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Reviews Immunology.* 17: 593-6231.
- Adler H, Straub C, Frei R 2005. Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *Europe Journal Clinical Microbiology Infection Disease* 24: 449-500.
- Almeida C M C, Vasconcelos-Júnior A C, Kipnis A, Andrade A L, Junqueira-Kipnis A P 2008. Humoral Immune Responses of Tuberculosis Patients in Brazil Indicate Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 579-581.
- American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines 2002. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46: 328-46.
- Andersen P 2007. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends in Microbiology* 15: 7-13.
- Andersson A K, Li C, Brennan F M 2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rev. Ther.* 10: 204-213.
- Annunziato F, Cosmi F, Santarlaschi V, Maggi L, Liotta F 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204: 1849-1861.
- Araújo-Filho J A, Vasconcelos-Júnior A C, Sousa E M, Kipnis A, Junqueira-Kipnis A P 2008. Cellular responses to MPT-51, GlcB and ESAT-6 among MDR-TB and active tuberculosis patients in Brazil. *Tuberculosis* 88: 474-81.
- Ardeleanu C, Andrei F, Ceașu M, Ene D, Mihai M, Butur G, Staniceanu F, Dobrea C, Galbenu P, Vasilescu F 2004. Cellular immune response in atypical tuberculosis diagnosed by PCR in paraffin embedded material. *Rom Journal Morphologycal Embryology* 45: 63-72.
- Arend S M, Geluk A, van Meijgaarden K E, van Dissel J T, Theisen M, Andersen P, Ottenhoff T H M 2000. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infection and Immunity* 68: 3314-21.
- Arend W P, Dayer J M 1995. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38: 151-160.

- Babu S, Bhat S Q, Kumar N P, Kumaraswami V, Nutman T B 2010. Regulatory T cells modulate Th17 responses in patients with positive tuberculin skin test results. *J. Infect. Dis.* 201: 20-31.
- Barcelos W, Martins-Filho O A, Guimarães T M P D, Oliveira M H P, Spíndola-de-Miranda S, Carvalho B N, Toledo V P C P 2006. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. *Microbiology and Immunology* 50: 597-605.
- Barnes P F, Chatterjee D, Abrams J S, Lu S, Wang E, Yamamura M, Brennan P J, Modlin R L 1992. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan Relationship to chemical structure. *Journal Immunology* 149: 541-47.
- Barry C E, Boshoff H I, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, Schnappingers D, Wilkinson R J, Young D 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 845-855.
- Beck J S, Potts R C, Kardjito T, Grange J M 1985. T4 lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 60: 49-54.
- Belkaid Y, Piccirillo C A, Mendez S, Shevach E M, Sacks D L 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 420: 502-507.
- Belkaid Y, Rouse B T 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* 6: 353–360.
- Berner B, Akça D, Jung T, Muller G A, Reuss-Borst M A 2000. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J. Rheumatol.* 27: 1128-11335.
- Bértolo M B, Brenol C V, Schainberg C G, Neubarth F, Lima F A C, Laurindo I M, Silveira I G, Pereira I A, Loures M A R, Azevedo M N, Freitas M V C, Neto M S P, Xavier R M, Giorgi R D N, Kowalski S C, Anti S M A 2007. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. *Rev. Bras. Reumatol.* 47: 151-159.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard J C 1997. Cellular response to interferon- γ . *Annual Review Immunology* 15: 749-795.
- Boesen H, Jensen B N, Wilcke T, Andersen P 1995. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 63: 1491-7.
- Bonato V L, Lima V M, Tascom R E, Lowrie D P, Silva C L 1998. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infection Immunology* 66: 169-75.
- Bonecini-Almeida M G, Ho J L, Boéchat N, Huard R C, Chitale S, Doo H, Geng J, Rego L, Lazzarini L C, Kritski A L, Johnson W D Jr, McCaffrey T A, Silva J R 2004. Down-Modulation of Lung Immune Responses by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Analysis of TGF- β Receptors I and II in Active Tuberculosis. *Infection And Immunity* 2628–263404.
- Boussiotis V A, Tsai E Y, Yunis E J, Thim S, Delgado J C C, Dascher C, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes J M, Goldfeld A E 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.* 105: 1317–1325.
- Brandt L, Skeiky Y A W, Alderson M R, Lobet Y, Dalemans W, Turner O C, Basaraba R J, Izzo A A, Lasco T M, Chapman P L, Reed S G, Orme I M 2004. The protective effect of the *Mycobacte-*

- rium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infection Immunology* 72: 6622-32.
- Brenann P J 2003. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. Elsevier 83: 91-97.
- Brennan P J, Nikaido H 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29-63.
- Burl S, Hill P C, Jeffries D J, Holland M J, Fox A, Lugos M D, Adgbola R A, Rook G A, Zumla A, McAdam K P W J, Brookes R H 2007. FOXP3 gene expression in a tuberculosis case contact study. *Clinical & Experimental Immunology* 149: 117-122.
- Caruso A M, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom B R, Flynn J L 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol.* 162: 5407-5416.
- Cave A J E 1939. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient. *Egypt. Br. Tuberc.* 33: 142-52.
- Chan J, Fan X D, Hunter S W, Brennan P J, Bloom B R 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect and Immunology*. 59: 1755-1761.
- Chan J, Flynn J L 1999. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: Fang, F C, editor. Nitric oxide and infection. New York: Kluwer Academic Plenum; p. 281-310.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo R S, Bloom B R 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 175: 1111-1122.
- Chatterjee D, Bozic C M, Mcneil M, Brennan P J 1991. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 266: 9652-9660.
- Chen X B, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E 2007. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clinical Experimental Immunology* 123: 50-59.
- Chen X, Zhang M, Liao M, Graner M W, Wu C, Yang Q, Liu H, Zhou B 2010. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlate with IL-6R expression on CD4+T cells. *Am. J. Res. Crit. Care. Med.* 181: 734-742.
- Chiacchio T, Casetti R, Butera O, Vanini V, Carrara S, Girardi E, Miltri D D, Battistini L, Martini F, Borsellino G, Goletti D 2009. Characterization of regulatory T cells indentified as CD4+CD25^{high}CD39+ in patients with active tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 156: 463-470.
- Choy E H, Panayi G S 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 344: 907-916.
- Cifone M G, Ulisse S, Santoni A 2001. Natural killer cells and nitric oxide. *International Immunopharmacology* 1: 1513-24.

- Clay H, Davis J M, Beery D, Huttenlocher A, Lyons S E, Ramakrishnan L 2007. Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe*. 2: 29-39.
- Cohn Z A 1963. The fate of bacteria within phagocytic cells. I. The degradation of isotopically labeled bacteria by polymorphonuclear leucocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 117: 27-42.
- Collins H L, Kaufmann S H E 2001. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunol.* 103:1-9.
- Cooper A M, Dalton D K, Stewart T A, Griffin J P, Russel D G, Orme I M 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *JEM.* 178: 2243-2247
- Corbett E L, Watt C J, Walker N, Maher D, Williams B G, Raviglione M C, Dye C 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Intern. Med.* 163:1009-1021.
- Crome S Q, Wang A Y, Kang C Y, Levings M K 2009. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 39: 1480-1493.
- Crump J A, Tanner D C, Mirrett S, McKnight C M, Reller L B 2003. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB and ISOLATOR 10 Systems for detection of mycobacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1987-1990.
- Cruz A, Khader S A, Torrado E, Fraga A, Pearl J E, Pedrosa J, Cooper A M, Castro A G 2009. IFN- γ regulates the induction and expansion of IL-17 producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J. Immunol.* 177: 1416–1420.
- Curtis M M, Way S S 2009. Interleukin-17 in host defense against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology.* 126: 177-185.
- Daffé M, Draper P 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microbiol. Physiol.* 39:131-209.
- Daffé M, Etienne G 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Diseases* 79: 153-169.
- Daniel T M 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100: 1862-1870.
- Dannenberg A M 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today.* 12: 228-234.
- Davis J M, Ramakrishnan L 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection. *Cell.* 136: 37-49.
- Derrick S C, Repique C, Snoy P, Yang A L, Morris S 2004. Immunization with a DNA Vaccine Cocktail protects Mice Lacking CD4 cells against an Aerogenic Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 72: 1685-92.
- Desem N, Jones S L 1998. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Diag. Labor. Immunol.* 5: 531-536.

Doherty T, Ardite M 2004. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *Journal of Clinical Investigation* 12:1699-1703.

Dye C, Sheele S, Dolin P, Pathania V, Ravigliione M C 1999. Global burden of tuberculosis: estimate incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA*. 282: 677-686.

Edwards D, Kirkpatrick C H 1986. The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.* 134: 1062-1071.

Eftimiou P, Sood Sunita 2007. QuantiFERON TB Gold Test: the new standard for screening of latent tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* 66: 276.

Ernst J D 1998. Macrophages receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 66: 12377-81.

Ernst J D, Trevejo-Nunez G, Banaiee N 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis and diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Invest.* 117: 1738-1745.

Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, Lakos G 2007. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: Suggested relationships with antigen-drive immune responses. *J. Autoimmun.* 29: 154-163.

Flesch I, Kaufmann S H 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138: 4408-4413.

Flynn J L, Chan J 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual Review Immunology* 19: 93-129.

Flynn J L, Chan J, Triebold K J, Dalton D K, Stewart T A, Bloom B R 1993. An essential role of interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JEM*. 178: 2249-2254.

Fontenot J D, Gavin M A, Rundensky A Y 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4: 330-336.

Fontenot J D, Rasmussen J P, Williams L M, Dooley J L, Farr A G, Rudenski A Y 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22: 329-341.

[Franco L H](#), [Silva C L](#), [Castelo A A M C](#), [Trombone A P](#), Moretto E L, [Jamur M C](#), [Oliver C](#), Bonato V L D 2008. A DNA vaccine against tuberculosis based on the 65 kDa heat-shock protein differentially activates human macrophages and dendritic cells. *Genetica Vaccines and Therapy*. 6: 3-13.

Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas M I, Cabral A R 2007. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmune Rev.* 6: 169-175.

Gardam M A, Keystone E C, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R 2003. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis.* 3: 148-155.

Geluk A, van Meijgaarden K E, Franken K L M C, Drijfhout J W, D'Souza S, Necker A, Huygen K, Ottenhoff T H M 2000. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *Journal of Immunology* 165: 6463-647.

Gerosa F, [Gerosa F](#), [Nisii C](#), [Righetti S](#), [Micciolo R](#), [Marchesini M](#), [Cazzadori A](#), [Trinchieri G](#) 1999. CD4⁺ T Cell Clones Producing both Interferon- γ and Interleukin-10 Predominate in Bronchoalveolar Lavages of Active Pulmonary Tuberculosis Patients. *Clinical Immunology* 92: 224-234.

Guyot-Revol V, John A I, Hackfort S, Hinks T, Lalvani A 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 173: 803–810.
Harrington L E, Mangan P R, Weaver C T 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 349–56.

Hirsch C S, Toossi Z, Johnson J L, Luzze H, Ntambi L, Peters P, McHugh M, Okwera A, Joloba M, Mugenyi P, Mugerwa R D, Terebuh P, Ellner J J 2001. Augmentation of apoptosis and interferon- γ production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 183: 779-788.

Hirsch C S, Z. Toossi Z, Vanham G, Johnson J L, Peters P, Okwera A, Mugerwa R, Mugenyi P, Ellner J J 1999. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 179: 945-953.

Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies W, Jong G, Reiner N E 1998. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature Class II heterodimers. *J. Immunol.* 162: 4882-4893.

Hougardy J M, Place S, Hildebrand M, Drowart A, Debie A S, Loch C, Marcart F 2007b. Regulatory T cells depress immune response to protective antigens in active tuberculosis. *Am. J. Res. Crit. Care. Med.* 176: 409-416.

Hougardy J M, Verscheure V, Loch C, Marcart F 2007a. In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low/-} regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy *Mycobacterium tuberculosis* infected humans. *Microbes Infection* 9: 1325-32.

James B W, Williams A, Mash P D 2000. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 88: 669-677.

Junqueira-Kipnis A P, Basaraba R J, Gruppo V, Palanisamy G, Turner O C, Hsu T, Jacobs Jr W R, Fulton S A, Reba S M, Boom W H, Orme I M 2006. Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce in the lungs of mice lacking interferon- γ . *Immunology* 119: 224-231.

Junqueira-Kipnis A P, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero M G, Diefenbach A, Raulet D H, Turner J, Orme I M 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *Journal of Immunology* 171: 6039-45.

Kaene J, Katarzyna M, Balcewicz S, Remold H 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophages apoptosis. *Infection Immunol.* 65:298-304.

Kaufmann S, Winau F 2005. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. *Nature Immunology* 11: 1063-1066.

Kaufmann S H E 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*. 1: 20-30.

Kaufmann S H E 2004. New issues in tuberculosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63: 1150-1156.

Keane J 2001. Tuberculosis associated with infliximab. *N. Engl. J. Med.* 345: 1098-1104.

- Khader S A, Bell G K, Pearl J E, Fountain J J, Rangel-Moreno J, Cilley G E, Shen F, Eaton S M, Gaffen S L, Swain S L, Locksley R M, Haynes L, Randall T D, Cooper A M 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* 8: 369–377.
- Kimura A, Naka T, Kishimoto T 2007. IL-6-dependent and –independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *PNAS.* 104: 12099-12104.
- Kinhikar A G, Vargas D, Li H, Mahaffey S B, Hinds L, Belisle J T, Laal S 2006. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesion. *Mol. Microbiol.* 60: 999-1013.
- Kraan M C, Reece R J, Barg E C, Smeets T J M, Farnell J, Rosenberg R, Veale D J, Breedveld F C, Emery P, Tak P P 2000. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: Findings in a prospective, randomized, double-blind, parallel-design clinical trial in thirty-nine patients at two centers. *Arthritis Rheumatol.* 43: 1820-1830.
- Lenarczyk A, Helsloot J, Farmer K, Peters L, Sturgess A, Kirkham B 2000. Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls. *Clin. Exp. Immunol.* 122: 41-8.
- León D P, Acevedo-Vasquez E, Sanchez-Torres A, Cucho M, Alfaro J, Perich R, Pastor C, Harrison J, Sánchez-Schuwartz C 2005. Attenuated response to purified protein derivative in patients with rheumatoid arthritis: study in a population with a high prevalence of tuberculosis. *Ann. Rheum. Dis.* 64: 1360-1361.
- Lesley R, Ramakrishnan L 2008. Insights into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 277-283.
- Li L, Sui-hua L, Chang-you W 2007. Increased frequency of CD4⁺CD25^{high} Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN- γ by CD4⁺ T cells from TB patients. *Tuberculosis* 87: 526-234.
- Light R W 2002. Pleural effusion. *N. Engl. J. Med.* 346: 1971-1977.
- [Lima V M F](#), Bonato V L D, [Lima K M](#), [Santos S A](#), [Santos-Júnior R R](#), [Faccioli L H](#), Brandão I T, [Rodrigues-Júnior J M](#), [Silva C L](#) 2001. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infection and Immunity.* 69: 5305-5312.
- Lin P L, Flynn J L 2010. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J. Immunol.* 185: 15-22.
- Lipski P E 2006. Artrite reumatóide. In: Fauci A S, Braunwald E, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L, et al, editors. Harrison: Princípios de Medicina Interna. Rio de Janeiro: *McGraw-Hill*; p. 2064-73.
- Maglione P J, Xu J, Chan J 2007. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 178: 7222-7244.
- Maldonado J 1999. La Tuberculosis vuelve a ser un grave problema de salud. Iladiba [On line] Disponible en: <http://www.iladiba.com>

- Mangan P R, Harrington L E, O'Quinn D B, Helms W S, Bullard D C, C. O. Elson C O, Hatton R D, Wahl S M, Schoeb T R, Weaveret C T 2006. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441: 231–234.
- Marques C D, Duarte A L, de Lorena V M, Souza J R, Souza W V, de Miranda Gomes Y 2009. Evaluation of an interferon gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 30: 57-62.
- Matulis G, Juni P, Villiger P M, Gadola S D 2008. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific interferon gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67: 84-90.
- McInnes I B, Schett G 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 429-442.
- Ministério da Saúde, Datasus 2009.
- Mohaghehpour N, Gammon D, Kawamura L M, Van V A, Benike C J, Engleman E G 1998. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. *J. Immunol.* 161: 2400-2406.
- MS/SVS 2009. Ministério da Saúde. Datasus: Informações em saúde. <http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>.2009.
- Munoz-Elias E J, Mckinney J D 2005. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat. Med.* 11: 638-644.
- Newport M J, Huxley C M, Huston S, Hawrylowicz C M, Oostra B A, Williamson R, Levin M 1996. A mutation in the interferon- γ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *New England J. Med.* 335: 1941-1949.
- Nicholson S, Bonecini-Almeida M G, Lapa e Silva J R, Nathan C, Xie Q W, Mumford R, Weidner J R, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho J L 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine* 183: 2293-2302.
- O'Garra A, P Vieira 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10: 801–805.
- Oldenhove G, Heusch M, Urbain-Vansanten G , Urbain J, Maliszewski C, Leo O, Moser M 2003. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells *in vivo*. *Journal Experimental of Medicine* 198: 259-266.
- Orme I 2003. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis* 83: 112-115.
- Orme I M, Collins F M 1984. Adoptative protection of the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung. *Cell. Immunol.* 84: 113-120.
- Ouyang W, Kolls J K, Zheng Y 2008. The biological functions of T helper 17 cell effectors cytokines in inflammation. *Immunity* 28: 454–467.
- Panayi G, Corrigall V, Pitzalis C 2001. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and others beasts. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 27: 1-18.

- Park H Y, [Kwon Y S](#), Ki C S, Suh G Y, Chung M P, Kim H, Kwon O J, Koh W J 2008. Interleukin-12 receptor beta 1 polymorphisms and nontuberculous mycobacterial lung diseases *Lung* 186: 241-245.
- Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Constantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, Cassatella M A 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 115: 335-343.
- Raja A 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 120: 213-223.
- Rastogi N, Sola C 2007. Molecular evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. (www.tuberculosis-textbook.com) Cap. 2 Pg. 53-91.
- Ribeiro-Rodrigues R, Resende T C, Rojas R, Toosi Z, Dietze R, Boom W H, Maciel E, Hirsch C S 2006. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clinical Experimental Immunology* 144: 25-34.
- Roberts G D 1991. Manual of clinical microbiology. *Mycobacterium*. Washington DC. Book; 304-339.
- Roberts T, Beyers N, Aguirre A, Walzl G 2007. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- γ production and CD25 expression with elevated Forkhead Box P3, transforming growth factor- β , and interleukin-4 mRNA levels. *JID* 195: 870-878.
- Rook G A 2007. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Current Molecular Medicine* 7: 327-337.
- Sadek M, Sada E, Tossi Z, Schwander S K, Rich E A 1998. Chemokines induced by infections of mononuclear phagocytes with *Mycobacteria* and present in lung Alveoli during active pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology* 19: 513-521.
- Sakaguchi S 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. *Nat. Immunol.* 6: 345-352.
- Salgame, P. 2005. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 374-380.
- Sano K, Haneda K, Tamura G, Shirato K 1999. Ovalbumin (OVA) AND *Mycobacterium tuberculosis* bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper cells forward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology* 20: 1260-1267.
- Santarlaschi V, [Maggi L](#), [Capone M](#), [Frosali F](#), [Querci V](#), [De Palma R](#), [Liotta F](#), [Cosmi L](#), [Maggi E](#), [Romagnani S](#), [Annunziato F](#) 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 39: 207-215.
- Saunders B M, Cooper A M 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell. Biol.* 78: 334-341.
- Schluger N 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respiratory Research* 2: 157-163.
- Scriba T J, Kalsdorf B, Abrahams D, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, Hassan H Y, Wilkinson R J, Walzl G, Gerderbloem S J, Mahomed H, Hussey G D, Hanekom W A 2008. Distinct, Specific IL-17

and IL-22-producing CD4⁺ T cells subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J. Immunol.* 180: 1962-1970.

Shevach E M 2002. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Rev.* 2: 389-400.

Shimao T 2003. Mortality rate of pulmonary TB in the late 19th century. *Kekkaku* 78: 633-6.

Shimao T 2005. Tuberculosis and its control-lessons from the past and future prospect. *Kekkaku* 80: 481-9.

Sibley L D, Hunter S W, Brennan P J, Krahenbuhl J L 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* 56:1232-1236.

Silva B D S, [da Silva E B](#), [do Nascimento I P](#), [Dos Reis M C](#), [Kipnis A](#), [Junqueira-Kipnis A P](#) 2009. MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 27: 4402-4407.

Silva J R L, Boéchat N 2004. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatologia pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30: 478-484.

Singh K K, Dong Y, Belisle J T, Harder J, Arora V K, Laal S 2005. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* recognized by antibodies during incipient, subclinical tuberculosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2: 354-358.

Skapenko A, Lipsky P E, Schulze-Koops H 2006. T cell activation as starter and motor of rheumatic inflammation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 305: 195-211.

Stenger S, Hanson D A, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi K R, Froelich C J, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli S A, Bloom B R, Krensky A M, Modlin R L 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-125.

Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I, Kishimoto S 1990. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 58: 3286-3296.

Tannus-Silva D G S, Silva, B D S, Junqueira-Kipnis A P, Rabahi M F 2010. Tuberculose em pacientes com artrite reumatóide: a dificuldade no diagnóstico da forma latente. *J. Bras. Pneumol.* 36: 243-251.

Teixeira H C, Abramo C, Munk M E 2007. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol.* 33: 323-334.

Tiwari R P, Tiwari D, Sanjay K G, Chandra R, Prakash S B 2004. Glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv are potential serological markers for diagnosis of active tuberculosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12: 465-473.

Ulrichs T, Kaufmann S H 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* 208: 261-269.

Ulrichs T, Kosmiadi G A, Trusov V, Jorg S, Pradi L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina S, Kaufmann S H 2004. Human tuberculosis granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structure to orchestrate local host in the lung. *J. Pathol.* 204: 217-228.

- Valli V, Peters E, Williams C, Shipp L, Barger A, Chladny J, Hoffmann W 2009. Optimizing methods in immunocytochemistry: one laboratory's experience. *Veterin. Clin. Pathol.* 3: 261-269.
- Van de Veerdonk F L, Gresnigt M S, Kullberg B J, van der Meer J W M, Joosten L A B, Netea M G 2009. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB.* 2: 776-788.
- Van Venrooij W J, Zendman A J, Pruijij G J 2006. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmune Rev.* 6: 37-41.
- Vasconcelos-Júnior A C, Araújo-Filho J A, Silva E B, Sousa E M, Kipnis A, Junqueira-Kipnis A P 2009. Limitations of the BCG vaccine and new prophylaxis strategies against human tuberculosis. *Einstein.* 7: 383-389.
- Wallet M A, Wallet S M, Guiulfo G, Sleasman J W, Goodenow M M 2010. IFN- γ primes macrophages for inflammatory activation by high molecular weight hyaluronan. *Cel. Immunol.* 262: 84-88.
- Wallis W J, Burge D J, Sabath D, Gardiner 2001. *M. tuberculosis* reports with etanercept (Enbrel) therapy. *Arthritis Rheum.* 44 Suppl 9:S78.
- Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackabar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD68+ cells. *J. Comp. Pathol.* 133: 223-243.
- Wayne L G 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and Latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 3: 908-914.
- Weyand C M, Goronzy J J, Takemura S, Kurtin P J 2000. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2: 457-463.
- World Health Organization. Who Report 2008: Rheumatoid Arthritis: Aspects in Prevalence and Incidence: World Health Organization; 2008.
- World Health Organization. Who Report 2009: Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva: World Health Organization; 2009.

9. ANEXOS

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL: Profa. Dr.^a Ana Paula Jesuquina Krim

Pesquisadores Participantes: André Krim, Arivaldo Carvalho, Francisco Júnior, João Alencar de Araújo Filho, Bruna Daniela de Sousa Silva, Francielle Poliana de Medeiros Rocha Guimarães e Susana de Paula Diniz.

TÍTULO: "Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa."

Área Temática: Grupo III
Local de realização: HC/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, analisou e aprovou, o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que Art. 14, necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Conselho Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMSA-HC/UFG, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões(es) e publicações(es).

O CEPMSA-HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer avaliação aleatória do estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas de Resolução 196/96 (Manual Operacional Para Comitê de Ética em Pesquisa – Item 1.1).

Para sua ciência, citamos:

Item 1 (página 17) do Manual Operacional para Comitê de Ética em Pesquisa, que diz: "A pós graduação pressupõe a existência de responsabilidade profissional, o desenvolvimento de competências nas áreas científica e metodológica e o conhecimento das normas de proteção aos sujeitos de pesquisa, por parte do pesquisador. Assim sendo, a pós graduação tem qualificação para assumir o papel de pesquisador responsável. Por outro lado, a participação de alunos de graduação em pesquisas pressupõe a orientação de um professor responsável pelas atividades do graduando e, portanto, o professor orientador deve figurar como pesquisador responsável


Prof. João Maria Coutinho Moraes
Coordenador do CEPMSA-HC/UFG

PROTÓCOLO CEPIM/HC/UFJF Nº 19507

Guilherme, 06/2009

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (S): Dr. Marcos José de Sá e Silva,
Doutor em Ciências da Saúde, Doutor em Física.

TÍTULO INICIAL: *Resposta humana a estímulos de natureza física: efeitos da
pressão com sensores momentâneos, avaliados no uso de sensores eletrônicos de tipo de
memória humana.*

TÍTULO MODIFICADO: *Resposta humana a estímulos de natureza física: efeitos da
pressão com sensores momentâneos.*

Área Temática: (2009.02)

Local de Realização: (01.12.01) - Departamento de Física Médica (Farmacologia)

DOCUMENTOS ANALISADOS:

*Informações, com justificativas, de necessidade para modificação no projeto de pesquisa,
após a avaliação de resposta, com os seguintes dados: sensores momentâneos,
momentâneos de natureza física: efeitos da pressão com sensores eletrônicos de tipo de
memória humana.*

*Com base de conhecimentos sobre a natureza humana, a modificação,
dados de tipo de resposta momentânea, com base, precedida por a área
modificada.*

Conclusões: que a Comissão de Ética em Medicina Humana e Farmacologia, *analisou e
aprovou* os documentos acima referidos, e que foram considerados em acordo com os princípios éticos
regidos, sobre a natureza humana e modificação proposta.


Fernando José Carlos Gomes
Coordenador do CEPIM/HC/UFJF

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, Imunologista. Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325 – IPTSP/UFG. Telefone: (62) 3209-6126.

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), na pesquisa indicada acima que será realizada na Universidade Federal de Goiás (Goiânia-Go). Após ler com atenção e ser esclarecido (a) sobre suas dúvidas, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Esta pesquisa tem como objetivo identificar e caracterizar células que são importantes na defesa contra *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa a doença Tuberculose). O resultado deste projeto tentará melhorar a metodologia de diagnóstico e tratamento desta doença. Os nomes dos pesquisadores envolvidos são: Arioldo Carvalho Vasconcelos Junior (Doutorando), Bruna Daniella de Souza Silva (Mestranda), Francielle Poliana de Medeiros Rocha Guimarães (Biomédica) e o pesquisador responsável Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com qualquer um de nós através do telefone (62) 3209 – 61 26.

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: (62) 3269 – 83 38 / (62) 3269 – 84 26.

O pesquisador gastará aproximadamente 20 minutos com você para explicar-lhe o motivo da pesquisa, anotar algumas informações sobre o seu estado de saúde atual e pedir o seu consentimento para participar neste projeto. Neste período, um questionário será preenchido para facilitar a análise dos resultados futuramente. Serão coletados 20mL do seu sangue para obtenção de soro e das células. Para coletar o seu sangue, o seu braço será esterilizado (limpado) com álcool, e depois de garrotear (amarrar um elástico) a parte superior do seu braço o sangue será coletado usando agulha e seringa esteril. Um banco de soros e células dos pacientes com tuberculose será formado para utilizar em estudos posteriores que auxiliem no diagnóstico da tuberculose.

Embora não exista nenhum risco em potencial durante a coleta de sangue, algumas vezes podem ocorrer vermelhidão e dor no local da coleta. Algumas pessoas podem desmaiar durante a coleta. Se isto acontecer interromperemos a sua participação imediatamente. Em qualquer momento da pesquisa você poderá desistir de participar sem nenhum prejuízo no tratamento e no acompanhamento médico.

Os dados obtidos, assim como o seu estado de saúde e os resultados dos testes realizados com o seu sangue serão mantidos confidenciais pelo pesquisador responsável.

Os seus dados pessoais não serão revelados em nenhum momento. Os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica internacional e não serão armazenados para estudos futuros.

Este estudo tem duração prevista de Julho de 2009 a Março de 2013. Você terá como benefício desta participação o seu hemograma e a contagem/porcentagem de células (linfócitos) no sangue. Os resultados serão enviados diretamente ao seu médico e você poderá obtê-los na sua próxima consulta. Não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Porém em caso de danos decorrentes

de sua participação na pesquisa, você terá direito a pleitear indenização junto à Instituição Financiadora – CNPq.

Consentimento da participação

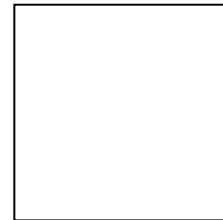
Eu, _____,
RG/CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, sob a responsabilidade da Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento médico.

Nome do participante (letra de forma): _____

Assinatura: _____

Local e Data: _____

Assinatura Dactiloscópica:



Testemunhas com RG.

1.Nome/assinatura: _____ RG: _____

2.Nome/assinatura: _____ RG: _____

Nome e assinatura do Pesquisador: _____

ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa intitulada “Resposta humoral e celular na tuberculose infecção latente em pacientes com artrite reumatóide”. O pesquisador responsável por esse projeto é o Dr. Marcelo Fouad Rabahi, especialista em doenças pulmonares.

Após ler com atenção este documento, ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte desta pesquisa assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Você ainda terá liberdade para sair do estudo a qualquer momento, se quiser, e sem precisar se explicar para isso. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato conosco, Dr. Marcelo ou Dra Daniela 3269-8385 e 3269-8350. Por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, você não terá direito a nenhuma remuneração. A recusa em participar não acarretará nenhuma penalização a você.

Trata-se de um estudo, que tem como objetivo avaliar a resposta imunológica para tuberculose em pacientes com artrite reumatóide. Acredita-se que pacientes com artrite reumatóide, em decorrência da própria doença ou pelas medicações utilizadas no seu tratamento, tem maior chance de desenvolver infecções, principalmente tuberculose. A pesquisa também tem como objetivo estudar, no paciente com artrite reumatóide, o resultado de um exame muito utilizado na tentativa de identificar pacientes que já tiveram contato com o bacilo da tuberculose: a prova tuberculínica e comparar esse resultado com exames de sangue mais recentemente utilizados. Estudaremos ainda alterações pulmonares que uma parcela dos pacientes com artrite reumatóide desenvolvem durante o curso de sua doença.

Para que essas avaliações sejam possíveis, serão necessárias na avaliação inicial: exame clínico, coleta de sangue, realização de radiografia de tórax e tomografia computadorizada de tórax, provas de função pulmonar e prova tuberculínica. Não haverá reavaliações a não ser que por algum problema técnico algum exame precise ser repetido.

Abaixo, uma breve descrição dos procedimentos envolvidos:

- 1) Coleta de sangue: será colhida em uma veia de seu antebraço cerca de 20ml de sangue para realização de exames que avaliam a resposta imune.
- 2) Radiografia e tomografia computadorizada de tórax: serão realizados para avaliar possível comprometimento pulmonar pela artrite reumatóide. São procedimentos indolores mas que vão expor você a um grau de radiação considerado seguro.
- 3) Prova de função pulmonar: será pedido que você encha bem o peito e sopre o mais forte e rápido que puder e por tanto tempo quanto conseguir em um bocal de uma máquina chamada espirometro. O exame será repetido após usar uma dose inalada de salbutamol. Nos pacientes em que

a espirometria estiver alterada outros dois exames poderão ser realizados no mesmo equipamento, com manobras respiratórias um pouco diferentes

4) Prova tuberculínica: é um exame que pode identificar indivíduos que tiveram contato com o bacilo da tuberculose. Consiste na aplicação de uma substância conhecida como PPD, que não causa alterações nocivas ao seu organismo e pode causar leve dor no local da aplicação, sendo normal o aparecimento de um nódulo endurecido e avermelhado nesse local. O teste será realizado por via intradérmica, na dose de 0,1ml – equivalente a 2UT (unidade tuberculínica) – na parte anterior do antebraço esquerdo, com seringa tipo insulina, de 1ml. A aplicação dos testes será realizada por profissional adequadamente treinado.

Os seus dados serão sigilosos e privados, sendo que você poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, se achar necessário, inclusive após a publicação da mesma.

Garantimos a você que os dados coletados serão utilizados apenas para essa pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.

Você não está abrindo mão de nenhum de seus direitos legais ao assinar este documento, incluindo seu direito relacionado à indenização por danos

Em caso de dúvidas sobre seus direitos com participante nessa pesquisa você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Hospital das Clínicas – UFG nos telefones: 3269-8338 / 3269-8426.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito da pesquisa

Eu, _____, RG/ CPF/ _____ abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado “Resposta humoral e celular na tuberculose infecção latente em pacientes com artrite reumatóide”, sob a responsabilidade da Dr Marcelo Fouad Rabahi como sujeito voluntário.

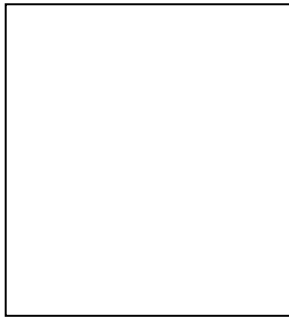
Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador

_____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Local e Data: _____

Nome e Assinatura do sujeito: _____

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

ANEXO 5 - Questionário dos Pacientes com Tuberculose e controles saudáveis

Questionário do projeto: Avaliação do papel das células Th17 e T reguladoras na resposta imune celular de pacientes com tuberculose pulmonar ativa.

Data: ____/____/____ Número do prontuário: _____

1. Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Raça: [] Branca [] Negra [] Amarela [] Parda [] Indígena [] Ignorada

Sexo: [] Masculino [] Feminino

Estado civil: _____ Grau de instrução: _____

End.Residencial: _____

_____ Bairro: _____

_____ Cidade: _____ Estado: _____

Fone: _____ Contato: _____

Ponto de referência: _____

Há quanto tempo mora nesta residência: [] 3-6 meses [] 7-12 meses [] >1 ano

End.anterior: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

**Observa-
ções:** _____

Cidade de origem: _____

Quanto tempo mora em Goiânia: _____

Número de indivíduos na residência: _____

2. End.Trabalho: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Fone: _____

Quanto tempo neste trabalho: _____

Ocupação / Ramo de atividade econômica: _____

3. Foi vacinado (a) com BCG: [] sim [] não [] não sabe

Tem cicatriz vacinal: [] sim [] não

Diagnóstico clínico _____

Local do diagnóstico: _____

Médico responsável: _____

Data de diagnóstico: ____/____/____

4. Exames:

-Raios-X do tórax: [] Suspeito [] Normal [] Não realizado.

-PPD: _____ mm.

-Baciloscopia de Escarro: ☐ Positiva ☐ Negativa ☐ Não Realizada

-Cultura: ☐ Positiva ☐ Em Andamento ☐ Negativa ☐ Não Realizada.

-HIV: ☐ Positivo ☐ Em Andamento ☐ Negativo ☐ Não Realizado

5. Contatos:

Teve contato com TB ativa: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

Possui parentes com tuberculose que moram ou moraram na mesma casa:

☐ sim ☐ não ☐ não sabe

Convive ou já conviveu com amigos, vizinhos, namorados (as) portadores de tuberculose:

☐ sim ☐ não ☐ não sabe

Teve contato com hanseníase: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

TB ativa no momento: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

Sinais e sintomas: ☐ Tosse ☐ Escarro ☐ Hemoptise ☐ Emagrecimento ☐ Anorexia

☐ Sudorese noturna ☐ Febre

Outros: _____

6. Doenças associadas:

☐ Diabetes ☐ Doença Renal ☐ Doença Cardíaca ☐ Pressão Alta ☐ Hepatite ☐ HIV Ou-
tra _____

7. Faz uso de medicamentos: ☐ Sim ☐ não

Qual? _____

É alérgico (a): ☐ Sim ☐ não ☐ não sabe

A que? _____

8. Tratamento anti TB:

INH: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

RIF: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

ETH: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

PYZ: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

STP: ☐ sim ☐ não ☐ não sabe

Data de início do tratamento: ____/____/____ Esquema: _____

ANEXO 6 – Questionário dos Pacientes com Artrite Reumatóide

Nome: _____

Nº identificação _____ Data: _____

Data nasc: _____ Idade: _____

Sexo: () fem () masc Pront: _____

Endereço: _____

Telefone: () _____ Cel: () _____

Naturalidade: _____

Profissão: _____ Medico assistente: _____

Diagnóstico de AR há:

Medicação	Dose/dia	Medicação	Dose/dia

LTB ()sim ()não usa ACO()sim ()não Pode estar grávida()sim ()não () NA
Tabagista atual()sim ()não anterior()sim ()não() Anos/maço _____

Parou há: _____

Fogão a lenha ()sim ()não Anos/lenha: _____

Comorbidades e medicações: _____

Antecedentes profissionais: _____

Escolaridade: _____

Condições de moradia: _____

Já teve contato com tuberculose? ()sim ()não _____

Já fez PPD () sim ()não _____

Foi vacinado com BCG ()sim ()não ()não sabe

Tem cicatriz vacinal? ()sim ()não

Tosse() Expectorção() chiado () febre() perda de peso() inapetência()

Dispnéia()

Classificação	
Grau I	Dispnéia para atividade física intensa(correr, nadar, praticar esporte)
GrauII	Dispneia para caminhar apressadamente no plano ou quando sobe ladeira
Grau III	Anda mais devagar que pessoas da mesma idade devido a falta de ar ou quando caminha no plano no próprio passo tem que parar para descansar
Grau IV	Após andar alguns metros ou alguns minutos tem que parar para descansar
Grau V	Falta de ar impede que saia de casa ou surge falta de ar quando troca de roupa

Exame físico: _____

Consentimento ()

PPD () _____

Espirometria () _____

TCAR: ()

Coleta de Sangue ()

Critérios diagnósticos da AR

() Rigidez matinal por pelo menos 1h

() artrite de três ou mais articulações

() artrite de articulações de mãos

() artrite simétrica

() nódulo reumatóide

() fator reumatóide _____

() alterações radiográficas(erosões ou descalcificações em mãos e punhos)

OBS: Primeiros 4 critérios presentes por pelo menos 4 semanas

Necessários 4 dos 7 critérios.

Tuberculosis in rheumatoid arthritis patients: the difficulty in making the diagnosis of latent infection*

Tuberculose em pacientes com artrite reumatoide:
a dificuldade na diagnose de infecção latente

Daniela Grayer Schwartz Taveson Silva, Bruna Danielle de Sousa Silva,
Ana Paula Junqueira-Kipnis, Marcelo Fozard Kubek

Abstract

Since the beginning of the use of anti-TNF in the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases, cases of pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis have been reported in patients receiving such treatment. In most cases, the disease develops by the time the patient has received the sixth injection. Every patient should be evaluated for latent tuberculosis infection prior to the use of a TNF inhibitor. However, the diagnosis of latent tuberculosis infection is a challenge. The tuberculin test, which was the only test available to detect latent tuberculosis infection for nearly a century, presents a number of limitations. Tests based on the detection of the *in vitro* production of IFN- γ by mononuclear cells activated by specific antigens appear to be more accurate and have been studied in patients with rheumatoid arthritis.

Keywords: Tuberculosis, pulmonary, Arthritis, rheumatoid, Tumor necrosis factor alpha, Infection.

Resumo

Desde o início do uso de drogas anti-TNF para o tratamento da artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias, casos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar vêm sendo notificados em pacientes submetidos a tal tratamento. Na maioria dos casos, a doença se desenvolve durante as seis primeiras injeções. Todo paciente deve ser avaliado para tuberculose latente antes do início do uso de um bloqueador de TNF, no entanto, a diagnose de tuberculose latente é um desafio. A prova tuberculínica, a única teste disponível para a diagnose de tuberculose latente por quase um século, apresenta uma série de limitações. Testes baseados na diagnose de produção de IFN- γ *in vitro* por células mononucleares ativadas por antígenos específicos parecem ser mais precisos e vêm sendo pesquisados em pacientes com artrite reumatoide.

Palavras-chave: Tuberculose pulmonar, Artrite reumatoide, Fator de necrose tumoral α , Infecção.

Introduction

Worldwide, nearly 15,000 people develop tuberculosis every day and, in 2007, approximately 1.7 million died from this disease.^{1,2} These numbers make tuberculosis the leading cause of death from a curable infectious disease in adults. In Brazil, the numbers are also alarming. A total of 81,666 new cases were reported in 2006. In 2006, the annual incidence reported in Brazil was 61.7 cases per 100,000 population, whereas the annual incidence reported in the state of Goiás was 17.3% cases per 100,000 population. It is estimated that 50 million Brazilians are infected with the tuberculosis bacillus.^{3,4}

Approximately 5% of all individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* will develop active tuberculosis within the first two years after infection. Latent tuberculosis infection is defined as the period between the moment at which the bacilli enter the organism and the onset of active tuberculosis.^{5,6} The remaining 95% of exposed individuals will prevent the development of the disease via an effective cellular immune response. Elements that can affect immunity, such as co-infection (e.g., with HIV), comorbidity (e.g., diabetes mellitus, age, use of immunosuppressants) and nutri-

* Study carried out at the Federal University of Goiás Institute of Tropical Pathology and Public Health and at the Federal University of Goiás School of Medicine, Goiânia, Brazil.

Correspondence to: Daniela Grayer Schwartz Taveson Silva Rua 14-av, casa 15, 131, Santa Helena, CEP 74.160-136, Goiânia, GO, Brazil.

1st of 1st of 2008-1018. E-mail: daniela@unigoiás.com.br

Financial support: This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Submitted: 22 October 2008 Accepted, after review: 14 January 2009

tional status, prevent the development of the disease. Rheumatoid arthritis (RA) is a complexity that has gained considerable interest in the last decade. In this period, biological agents, also known as new drugs that alter the course of the disease, have been introduced. Among the biological agents available in Brazil are TNF inhibitors (anti-TNF). Since the beginning of the use of anti-TNF, cases of pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis have been reported in patients receiving such treatment.¹²

The objective of the present article is to discuss the diagnosis of latent tuberculosis infection in RA patients, which allows the indication of treatment of the latent infection prior to the use of anti-TNF, thereby reducing the incidence of active tuberculosis in this population.

Clinical case

We report the case of a 41-year-old female housemaker from the city of Pinarópolis, located in the state of Goiás, Brazil. The patient had previously been diagnosed with arterial hypertension and had been using enalapril for several years. In addition, she had been diagnosed with RA more than two years prior. During that period, she was treated with various therapeutic regimens for RA. She had been under treatment prednisone (5 mg/day) and methotrexate. Since she continued to have many joint symptoms, adalimumab was also prescribed. After two months of adalimumab treatment, the patient began to have low fever almost daily, as well as mild dry cough and mild asthma. She sought medical attention at an emergency room in the city of Goiânia, also located in the state of Goiás, and was diagnosed with pneumonia after a chest X-ray (Figure 1). The patient used azithromycin (500 mg) for five days, in accordance with a prescription. The patient initially presented a slight improvement, but the dry cough and fever returned after the medication was discontinued. Two months later, since her clinical profile remained the same, she sought medical attention again, at which point a two-day course of levofloxacin (500 mg/day) was prescribed. Again, she presented a slight improvement but the symptoms reappeared after the end of the course.

The patient stated that she was not a smoker or an alcoholic. She reported that she had tested negative on a tuberculin skin test

[TST] conducted before the initiation of adalimumab treatment, and that, according to the rheumatologist who treated her, a chest X-ray performed at the time was normal. After the use of azithromycin (three and half months prior), she also received an additional infusion of adalimumab. Physical examination revealed mild pallor and no palpable lymph node enlargement. There were fine rales in the upper third of the left hemithorax and coarse rales in the middle third of the right hemithorax, as well as scattered rhonchi. Her hands and feet had joint deformities. A chest X-ray revealed alveolar opacities in the left upper lobe, left lower lobe and middle lobe, as well as images suggestive of bronchogram dissemination (Figure 2). A CT scan of the chest revealed tree-in-bud centrilobular opacities (Figure 3).

Another TST was performed, and the result was again negative (inhibition, 0 mm). Two consecutive sputum samples were smear-negative (Ziehl-Neelsen staining). The patient underwent bronchoscopy, which showed a whitish infiltrative lesion involving 50% of the bronchial lumen of the left upper lobe as well as intense adjacent inflammatory reaction. The anatomopathological examination of the bronchial lesion revealed an extensive, chronic granulomatous inflammatory response with neoplastic reaction. There were no signs of malignancy. The bronchoalveolar lavage fluid tested positive for AFB in smear microscopy. The patient was diagnosed with pulmonary tuberculosis, and treatment with regimen 1 (isoniazid/riboflavin/pyrazinamide) was initiated. She presented favorable evolution, showing improvement in the symptoms and in the radiological aspect thirty days later. The patient was discharged after six months of treatment, showing complete resolution of the respiratory symptoms and significant improvement in the chest X-ray results (Figure 4).

Inflammatory response in RA and in tuberculosis

It is known that RA is a chronic inflammatory disease, is autoimmune, has unknown etiology and affects all ethnic groups worldwide. Females are more often affected than are males (ratio = 1.5:1). Although the onset of RA can occur at any age, its incidence peaks between the fourth and fifth decades of life. The disease is clinically characterized by symmetrical



Figure 1 - Chest X-ray revealing a clear lung field with no significant opacities in the left upper lobe.

peripheral polyarthritis, which leads to deformity and destruction of the joints due to bone and cartilage erosion. Hands, fingers, toes, knees and feet are most commonly affected. In addition, nonspecific constitutional symptoms, such as fatigue, anorexia, weight loss and weight gain, can occur.¹⁻³ The principal alterations in the synovial membrane of such patients are as follows: hyperplasia, vascular alterations, including microvascular injury, thrombosis and neovascularization, edema, and inflammatory cell infiltrate composed primarily of CD4⁺ T cells. Antigen-activated CD4⁺ T cells stimulate monocytes, macrophages and synovial fibroblasts to produce the cytokines IL-1, IL-6 and TNF- α , as well as to secrete metalloproteinases, through the surface markers CD80 and CD86 and through the release of soluble molecules, such as



Figure 2 - Chest X-ray revealing bilateral opacities in the left upper lobe and bilaterally at the lung bases, as well as images suggestive of bronchopneumonia in the middle third of the left hemithorax.

TNF- γ and IL-17. In addition, the activated CD4⁺ T cells stimulate B cells to produce immunoglobulins, including the rheumatoid factor. The principal cytokines responsible for inflammation in RA are IL-1, IL-6 and TNF- α . The cytokines IL-1 and TNF- α stimulate the cells of the synovial membrane to produce collagenases and other proteases, as well as activating chondrocytes, stimulating them to produce proteolytic enzymes that can locally degrade cartilage. Finally, IL-1 and TNF- α can contribute to local demineralization through osteoclast activation.^{1,2}

^{1,2} Being an inflammatory cytokine, TNF- α plays an important and perhaps dominant role in rheumatoid synovitis. In a study of synovial cell cultures from RA patients, TNF- α inhibition by antibodies significantly reduced the production of IL-1, IL-6, IL-8 and GM-CSF. Therefore, it is likely that TNF- α inhibition has a more global effect on inflammation than does the inhibition of other cytokines that are present in high concentrations in the synovial liquid, such as IL-1.^{1,2} The treatment of RA includes symptomatic medication for pain control, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids, and drugs that alter the course of the disease, such as hydroxychloroquine, sulfasalazine, methotrexate, leflunomide, azathioprine and cyclosporine. In patients who continue to have significant joint symptoms, despite the use of combinations of these drugs, biological agents, among which is anti-TNF, are indicated.^{1,2}

Consequently, the effectiveness of the cellular immune response in tuberculosis depends, in part, on the ability to produce an appropriate cytokine profile, including TNF- α . Being involved in the increased capacity of macrophages to phagocytose and destroy mycobacteria, TNF- α is a pro-inflammatory cytokine with an important role in the pathogenesis of tuberculosis. In addition, the production and release of TNF- α are essential for the formation of granulomas that sequester mycobacteria and prevent their dissemination.¹²

TNF- α inhibitors and tuberculosis

Drugs that inhibit TNF- α have been developed and used in RA patients with the objective of neutralizing the deleterious effects of this inflammatory cytokine. To date, there are three drugs available to patients who are refractory to conventional treatments for RA, including



Figure 3 - Chest CT scan revealing two small nodules predominantly in the upper portions of the left lung.

to methotrexate: two humanized monoclonal antibodies—infliximab and adalimumab—and a fusion protein composed of two TNF α units hybridized to the Fc portion of human IgG1, which acts as a competitive TNF inhibitor—etanercept.¹⁸ These three agents have been proven to be effective and safe in patients with initial or established disease, improving quality of life and minimizing the progression of radiological damage.¹⁹⁻²¹ However, since the beginning of the use of anti-TNF- α , hundreds of cases of pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis have been reported in patients receiving such treatment. In a survey of all cases reported to the Food and Drug Administration up to May of 2001, it was observed that, among

the 140,000 patients treated with infliximab, there were 19 reported cases of tuberculosis, 40 of which were cases of extrapulmonary tuberculosis. In most cases (50%), tuberculosis developed by the time the patient had received the sixth infusion.²² Other studies have demonstrated an increased incidence of tuberculosis in patients treated with anti-TNF.²³ Therefore, patients receiving anti-TNF should be considered to be at risk for progression of a recently acquired infection to active tuberculosis or for reactivation of a remotely acquired infection.²⁴

Latent Infection

Every candidate for anti-TNF treatment should be evaluated for latent tuberculosis infection prior to the initiation of such treatment.^{24,25} The diagnosis of latent tuberculosis infection is a challenge. It is not possible to detect the presence of latent mycobacteria in the body directly. In general, patients do not have any clinical complaints or radiological abnormalities. In accordance with the 10 Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis, candidates for anti-TNF treatment who have a TST induration ≥ 5 mm should receive treatment for latent infection—started at a dose of 5–10 mg/kg of body weight (up to 300 mg/day) for 6 months—and anti-TNF treatment should be initiated only after at least one month of isoniazid treatment.²⁶ Patients with negative TST results but with a history of tuberculosis, without adequate treatment or a chest X-ray suggestive of sequelae of tuberculosis, would also be candidates for treatment of latent tuberculosis infection.²⁷⁻²⁹

A major complicating factor for the diagnosis of latent tuberculosis infection in RA patients is the abnormal cellular immune function observed in such patients. Patients with RA would have an inability to produce an adequate response to the TST even when infected with *M. tuberculosis*.³⁰

The TST is the test that has been used the longest to diagnose latent tuberculosis infection. It is based on the cell reaction (accumulation of inflammatory cells) occurring in the skin 14–21 h after intradermal injection of PPD is mixture of proteins of low molecular weight.³¹ The TST, the only test available to detect latent tuberculosis infection for nearly a century, presents a number of limitations, some of which are of an operational nature (injection technique, reading

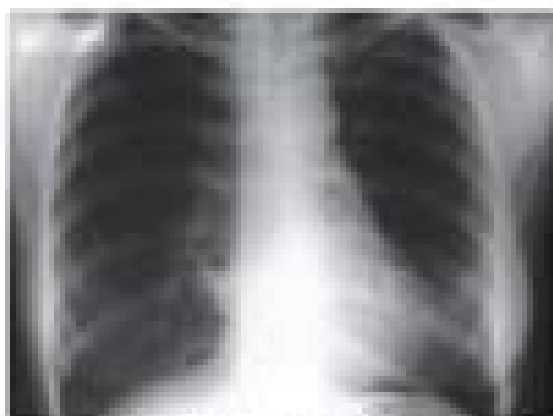


Figure 4 - Chest X-ray revealing significant improvement after the completion of tuberculosis treatment with isoniazid.

Chart 1 – Studies comparing rheumatoid arthritis patients and controls in terms of positive tuberculin skin test results.

Study	RA patients	Controls	RA patients presenting positive TST results	Controls presenting positive TST results
(place)	n	n	%	%
Ponte de Lenc et al. ¹²² Lima, Peru	111	96	76.6	76.6
Prado-Silva et al. ¹²³ Petrópolis, Italy	60		8.3*	
Martins et al. ¹²⁴ Pernambuco, Brazil	48	48	14.6*	11.3
Ernstberg et al. ¹²⁵ New York, USA	41	41	21.3	11.9
Isen et al. ¹²⁶ Istanbul, Turkey	18	60		20
	237/127		205/131	

RA, rheumatoid arthritis; and TST, tuberculin skin test. *Overall diagnosis of latent tuberculosis or 24-hr history of tuberculous or TST induction ≥ 5 mm or three 4-mm responses with previous tuberculosis: solidified within 3-year follow-up, or placed discharge. *Patients without a history of treatment for RA. *Patients with a history of treatment for RA, candidates for the use of anti-TNF.

technique and need for two visits to the laboratory) and some of which are of an immunological nature (booster effect, low specificity in individuals who have been vaccinated with BCG, cross-reaction with other mycobacteria and low sensitivity in immunocompromised patients).

In a study of 111 RA patients and 96 controls conducted in Lima, Peru, it was observed that 76.6% of the RA patients had negative TST results, in comparison with 76% of the controls. All patients received prednisone at doses lower than 7.5 mg/day, which are recognized as having no immunosuppressive effect.¹²²

More recently, in a study of 148 individuals (15 untreated RA patients, 11 RA patients, 11 patients with arkylosing spondylitis who were receiving immunosuppressants, and were candidates for treatment with biological agents and 60 healthy individuals), it was observed that the untreated RA patients had significantly smaller TST inductions than did the RA patients who were receiving immunosuppressants, the patients with arkylosing spondylitis and the controls, suggesting a direct effect of RA on TST results.¹²³

In a study of 60 RA patients, 18 patients with arkylosing spondylitis and 6 patients with psoriatic arthritis conducted in Italy, it was observed that 8.3% of the patients had positive TST results, whereas, overall, 14.6% of the patients were diagnosed with latent tuberculosis infection based on a history of tuberculosis, positive TST results or radiological lesions consistent

with sequelae of tuberculosis. The data obtained suggest that the TST is not sensitive enough to diagnose latent tuberculosis infection in RA patients and patients with other spondyloarthropathies.¹²⁴

In a recent study of 96 individuals (48 RA patients and 48 healthy controls) conducted in Pernambuco, Brazil, it was observed that 14.6% of the RA patients had positive TST results (induction ≥ 5 mm), in comparison with 11.3% of the patients in the control group (induction ≥ 10 mm).¹²⁵

A result that is in disagreement with previous findings was observed in a study conducted in the city of New York, USA. Considering that a positive TST result was defined as an induction ≥ 10 mm, 16.4% of the RA patients tested positive, in comparison with 11.3% of the controls. Using a TST cut-off point of 5 mm in the RA patients, 21.3% tested positive.¹²⁶

In addition, it is relevant to mention the study in which the use of treatment for latent tuberculosis infection in patients who would receive anti-TNF was based only on the TST results, there being 4 cases of active tuberculosis among the 43 patients included.¹²⁷

With the exception of the study conducted in New York, the other studies described showed a significantly lower percentage of positive TST results among RA patients (even when defining a positive TST result as an induction ≥ 5 mm) than among healthy controls, therefore suggesting that the TST has limited ability

to identify latent tuberculosis infection in the former group of patients (Chart 1).

New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection

The development of alternative tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection has been the subject of numerous studies. The identification of regions of the *M. tuberculosis* genome that are absent from BCG and environmental bacteria has allowed the development of new diagnostic tools. Two proteins encoded by the region of difference 1 (ESAT-6 and CFP-10), which is deleted during the transformation of *M. bovis* for the production of BCG vaccine, are used as specific antigens. These proteins induce a strong T cell immune response in experimental models, leading to the production of IFN- γ , which is quantified by the tests.¹²⁸ Two commercial tests for quantifying IFN- γ have been used in studies. The first uses ELISA technology and measures the concentration of IFN- γ released after incubation of whole blood with the specific antigen (QuantiferON-TB-Gold[®], Celsis Inc., Valencia, CA, USA). The other employs the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay using peripheral blood mononuclear cells that produce IFN- γ in response to the stimulation with the specific antigens (T-SPOT.TB[®], Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom).

The ELISA-based method presents high specificity in healthy individuals vaccinated with BCG (over 90% vs. 75.4% on the TST).¹²⁹ Studies of the correlation between the ELISA method and the TST show very different results in areas where tuberculosis is endemic than in areas where it is not. These results might be affected by the low specificity of the TST in populations vaccinated with BCG and by false-negative results obtained by the ELISA method, since the antigens used in the test are not the only ones responsible for the antigenicity of *M. tuberculosis*.¹³⁰

The use of the ELISA method for the diagnosis of latent tuberculosis infection in RA patients has been the subject of various studies in the last three years. In a study conducted in Lima, Peru, where tuberculosis is endemic (the estimated prevalence of latent tuberculosis infection is 40%), the use of the TST and the ELISA method in 101 RA patients and in 51 controls (patients with non-inflammatory rheumatic disorder) was compared. A positive

TST result was defined as an induration ≥ 5 mm in RA patients and an induration ≥ 10 mm in controls. The number of patients with positive ELISA results was comparable between the RA group and the control group (44.5% and 50.1%, respectively), whereas the number of patients with positive TST results for latent tuberculosis infection was significantly lower in the RA group than in the control group (26.7% vs. 55.6%).¹³¹

In a study of a population in which there was low tuberculosis endemicity—141 patients with rheumatic diseases (57 with spondyloarthritis, 40 with RA and 44 with other rheumatoid-pose disorders) was observed between the TST results and the results of the determination of IFN- γ . Positive ELISA results were more strongly associated with the presence of risk factors for latent tuberculosis infection and more weakly associated with BCG vaccination than were positive TST results (OR = 0.14, 95% CI: 0.05–1.47 vs. OR = 2.44, 95% CI: 0.74–8.01, $p = 0.015$). A history of BCG vaccination affected the TST results but not the ELISA results.¹³²

In a study of 200 patients with autoimmune diseases conducted in Rome, Italy, good concordance was observed between the TST and the ELISA method (87.5%). That was a population in which tuberculosis was not endemic, and only 4% of the patients studied had been vaccinated with BCG.¹³³

The other method for quantifying IFN- γ , the ELISPOT assay, has also been studied in RA patients. In a study of patients with autoimmune disease conducted in France, 48 patients were classified as either having latent tuberculosis infection ($n = 21$) or not having latent tuberculosis infection ($n = 11$), in accordance with clinical and radiological criteria and based on positive TST results (induration ≥ 10 mm), during the investigation of latent tuberculosis infection prior to the use of anti-TNF- α agents. After the ELISPOT assay was performed with antigens specific for tuberculosis, the number of positive results in the group of patients classified as having latent tuberculosis infection increased ($p = 0.001$). Of the 12 patients with latent tuberculosis infections regardless of the TST, 38.5% had negative TST results and 15.4% had negative ELISPOT results, demonstrating a greater sensitivity of the ELISPOT assay in relation to the TST.¹³⁴

In a recent study conducted in the state of Pernambuco, Brazil, the ELISPOT assay and the TST were performed in 48 RA patients and 48 healthy controls. Of the RA patients, 19% had positive ELISPOT results, whereas 14% had positive TST results. In the control group, 19% had positive TST results and 19% had positive ELISPOT results. Using different models for the identification of latent tuberculosis infection (positive TST results, positive TST results and chest X-ray abnormalities, positive TST results and household contact with active tuberculosis, positive TST results and radiological alterations, and household contact with active tuberculosis), a high specificity and a high negative predictive value were observed in the RA group, suggesting that, in that sample, the ELISPOT assay was more useful in identifying false-negative TST results (1.) positive ELISPOT results vs. 7 positive TST results). In addition, that study demonstrated the ability of the ELISPOT assay to confirm, with a high degree of certainty, that, in cases of negative TST results, latent tuberculosis infection is really absent. These authors concluded that, for the RA patients in that population, positive TST results did not need to be confirmed by the ELISPOT assay, and that treatment for latent tuberculosis infections should be initiated. In contrast, in cases with negative TST results and chest X-ray abnormalities or in those with household contact with active tuberculosis, false-negative results could be confirmed by the ELISPOT assay.¹²⁹

Final considerations

In summary, studies of tests for quantifying TNF- γ in the specific group of RA patients are still scarce. In addition, results vary significantly if we consider populations with different prevalences of latent tuberculosis infection. A great difficulty in evaluating the performance of such tests is the lack of a gold standard to identify true cases of latent tuberculosis infection, which makes it difficult to compare results among studies using different definitions. Another difficulty is the lack of standardization of the TST cut-off point: in the studies, a positive result being defined as ≥ 5 mm by some authors and as ≥ 10 mm by others.

In the case reported here, testing for latent tuberculosis infection was carried out in accordance with the current Brazilian guidelines, by

surveying the history of contacts and performing chest X-rays and TSTs. This case illustrates the possibility that RA patients can present active tuberculosis after the use of TNF inhibitors even without having latent infection, as identified by the methods currently used in Brazil. In addition, it demonstrates the delay in correctly diagnosing tuberculosis, a common situation even in a country with a high incidence of the disease. Therefore, the present case draws attention to the need for developing new diagnostic and management tools for this group of patients and, principally, to the need for monitoring patients for symptoms suggestive of active tuberculosis after starting treatment.

References

1. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization Global [cited 2009 Sep 15]. Global Tuberculosis Control - A short update to the 2008 report. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/
2. OMS/UNAIDS [homepage on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde [cited 2009 Sep 15]. TUBERCULOSE - Tais os conhecimentos científicos na ciência de enfrentar de forma de enfrentar - Livro Web Available from: <http://bvs2004.unaids.org/bvs2004web2004/unaidstb/tuberculosis/brazil/tuberculosis.pdf>
3. Coombs RW, de Witte PA, Hughes MD, Carlson JC, Palmer VC, Rubin EB, et al. W. Burstein Therapy Response Guidelines on tuberculosis. *J Gen Intern Med*. 2003;18(10):1013-42.
4. Carlson RW, Kopteva EC, Wagner B, Hansen S, Hansen S, Long B, et al. Anti-tubercular treatment before agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):100-10.
5. Light PE. Latent tuberculosis. In: Fauci AS, Braunholtz S, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 1064-73.
6. Bernaldo ME, Bernal CS, Schenberg CL, Teichgraber P, Lima RM, Lacerda RM, et al. *Recomendações de controle tuberculoso no diagnóstico e tratamento de artrite reumatoide*. Rio de Janeiro: 2001. 112 p.
7. American College of Rheumatology. Tuberculosis in Rheumatoid Arthritis. Guidelines. Guidelines for the management of Rheumatoid Arthritis. 2001 Update. Arthritis Rheum. 2001;44(12):128-40.
8. Chay EH, Pongpi U. Cytokine pathway and joint inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344(12):1001-10.
9. Tansman E, Shending B. The use of TNF-alpha blocking agents in Rheumatoid Arthritis: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(12):1009-107.
10. Machado LM, Salaff RM, Baumgarten GR, Trókel LS, Pinheiro RM, Salaff RM, et al. Fluorinated therapy in Rheumatoid Arthritis: A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1994;120(6):470-80.
11. Blot MJ, Mays WB, Feldman M, Kaplan JL, Brown C, Groves JE, et al. Randomized double-blind comparison

- of chronic myocardial infarction to detect serum factor alpha(A2) versus albumin in thrombotic patients. *Lancet*. 1994;343(8938):1194-16.
12. Kaper J, Girdhari L, Hsu HP, Moshir-Hosseini S, Kaperis J, Schinderman RB, et al. Tuberculosis associated with infliximab: a tumor necrosis factor alpha-inhibiting agent. *N Engl J Med*. 2001;345(15):1089-190.
13. Hahn HL, Hays GL, Tscholl G, Gardner M. Tuberculosis reopens with steroids (abstract) *Thorax (abstract)*. Abstracts Thorax. 2001;44 (suppl 3):14.
14. British Thoracic Society Standards of Care Committee. BTS recommendations for screening risk and for managing Mycobacterium tuberculosis infection and disease in patients due to start anti-TNF-alpha treatment. *Thorax*. 2009;64(10):888-9.
15. Pradessato G, Pizzarello MS, Sestini G. TB screening and anti-TNF alpha treatment. *Thorax*. 2009;64(1):13.
16. Lopez A, Sanchez R, Rodriguez MA, Lopez M. Performance of purified protein derivative in thrombotic patients who are not receiving immunosuppressive therapy. *Clin Rheumatol*. 2009;29(1):12-7.
17. Tenorio MC, Hsuene C, Mark MR. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):323-34.
18. Pardo de la Cruz B, Acosta-Viquez E, Sanchez-Torres A, Castro MA, Alfaro J, Pardo R, et al. Automated response to purified protein derivative in patients with diagnosed arthritis: study in a population with a high prevalence of tuberculosis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(9):1140-3.
19. Lopez A, Sanchez R, Rodriguez MA, Lopez M. Performance of purified protein derivative in thrombotic patients who are not receiving immunosuppressive therapy. *Clin Rheumatol*. 2009;29(1):12-7.
20. Marques VB, Duarte AL, Sousa VO, Sousa R, Sousa M, Sousa FM, et al. Response patterns on PPD in diagnosis of tubercle tuberculosis latent in patients with prior myocardial. *Rev Bras Neurol*. 2009;46(2):121-6.
21. Greenberg JM, Smith TM, Githens M, Kasper DL, Bartlett M, Newman DB, et al. Comparison of an in vivo tuberculosis interferon-gamma assay with dehydrated-type tuberculin testing for detection of latent Mycobacterium tuberculosis: a pilot study in thrombotic patients. *J Rheumatol*. 2008;35(4):1119-3. Review in: *J Rheumatol*. 2008;35(5):842.
22. Chen W, Chen QH, Huo YL, Huo YH, Liu J. Effectiveness of the combination of a whole blood interferon-gamma assay and the tuberculin skin test in detecting latent tuberculosis infection in thrombotic patients receiving statin-based therapy. *Arthritis Rheum*. 2008;50(6):888-9.
23. Anderson P, Mark MR, Pollock AK, Tubery TD. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2008;366(9374):1896-190.
24. Chen Y, Graham M, Yamaguchi T, Takahara T, Suzuki T, Kaper J, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using two antigens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(1):88-94.
25. Yang TH, Lee SH, Yoon SH, Cho B, Han SH, Son YL, et al. Concordance between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-risk country. *PLoS*. 2004;2(12):2184-6.
26. Pardo de la Cruz B, Acosta-Viquez E, Gomez L, Gutierrez E, Castro MA, Alfaro J, et al. Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with thrombotic arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol*. 2008;35(4):1140-3.
27. Mariti G, Jost R, Villego PM, Castro MA. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune disease: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(1):84-88.
28. Bataillon P, Duboisson L, Lohet B, Pouch J, Puel G, Malchaire M, et al. QuantiFERON-TB Gold and the TST are both useful for latent tuberculosis infection screening in autoimmune disease. *Res Respir J*. 2009;13(2):288-93.
29. Jellum A, Hovde M, Rye L, Børre O, Langeland M, Færevik T, et al. Comparison of in vitro-specific blood tests with tuberculin skin test for diagnosis of latent tuberculosis before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(12):1618-9.
30. Marques VB, Duarte AL, de Lencastre VO, Sousa R, Sousa M, de Almeida Gomes T, et al. Evaluation of an interferon gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in patients with thrombotic arthritis. *Rheumatol Int*. 2009; Epub 2009 Apr 11.

About the authors

Isabelle Oliveira Schwartz, Everson Silva

Pulmonologist, Federal University of Goiás Hospital das Clínicas, Goiânia, Brazil

Renata Damatta de Souza Silva

Physician, Institute of Tropical Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

Ana Paula Albuquerque Aguiar

Adjunct Professor, Federal University of Goiás Institute of Tropical Pathology and Public Health, Goiânia, Brazil

Marcelo Fausto Ribeiro

Adjunct Professor, Federal University of Goiás School of Medicine, Goiânia, Brazil