

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

# Comparação das respostas celulares imunes induzidas por proteínas filtradas da cultura de *Mycobacterium tuberculosis*

## Comparison of human cellular immune responses elicited by culture filtrate proteins of *Mycobacterium tuberculosis*

DIANE J. ORDWAY <sup>1</sup>, H. SILVEIRA <sup>2</sup>, L. COSTA <sup>3</sup>, S. COSTA <sup>4</sup>, M. MARTINS <sup>5</sup>, R. BADURA <sup>6</sup>, M.J. ARROZ <sup>7</sup>, H.M. DOCKRELL <sup>8</sup>, S. YOUNG <sup>9</sup>, F.A.A.N. VENTURA <sup>10</sup>.

1. Doutorada e investigadora no projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.
2. Professor Auxiliar, UEI Malária e Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.
3. Licenciada em Biologia e investigadora no projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.
4. Licenciada em Farmacologia e investigadora no projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.
5. Licenciada em Engenharia Biotecnológica e estagiária no projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.
6. Médico na especialidade de Doenças Infecciosas; interno complementar no 4º ano da mesma especialidade no Hospital de Santa Maria, Serviço de Doenças infecciosas piso 5 Rua Miguel Pais 46, 5F, 2830 Barreiro.
7. Assistente Hospitalar Graduada de Patologia Clínica; Responsável pelo Laboratório de Hematologia e de Citometria de Fluxo do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz, Rua da Junqueira 126, 1349-019 Lisboa, Portugal; Assistente convidada de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.
8. Assistente na Unidade de Imunologia da London School of Hygiene & Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Medicine, Immunology Unit - Keppel Street, London WC1E 7HT, UK.
9. Assistente na Unidade de Imunologia da London School of Hygiene & Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Medicine, Immunology Unit - Keppel Street, London WC1E 7HT, UK.
10. Coordenador da Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA, Palácio Bensaúde, Estrada da Luz, 153, 1600 Lisboa, Portugal; Responsável do projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal; Assistente hospitalar de Infeciologia, Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Hospital Egas Moniz, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal; Professor regente da disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

**Recebido para publicação: 02.09.16**

**Aceite para publicação: 02.10.31**

## RESUMO

Foram comparadas em doadores com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis as respostas blastogénicas e a produção de citocinas induzidas por dois filtrados de cultura de *Mycobacterium tuberculosis*, colectados em diferentes tempos. Tanto no grupo de doadores saudáveis, como no grupo de doentes com tuberculose pulmonar, as proteínas de curto prazo filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (*short term culture filtrate proteins-ST-CFP*) induziram uma produção mais marcada de INF- $\gamma$  do que as proteínas de médio prazo (*mid term culture filtrate proteins-MT-CFP*), enquanto que as MT-CFP induziram uma linfoproliferação mais elevada. Verificou-se uma heterogeneidade considerável nos controlos e os resultados indicaram que o contacto crónico e regular com doentes com tuberculose apresentaram respostas elevadas às ST-CFP. Em relação à estimulação com os perfis antigénicos, tanto a linfoproliferação como a produção de INF- $\gamma$  se encontravam reduzidas em doadores com tuberculose pulmonar, quando comparados com os controlos. A presença dos antigénios ESAT-6, 10 kDa, 19 kDa e 30 kDa do *M. tuberculosis* e do lipoarabinomanano (LAM), foi comparada em ambas as preparações utilizando o Western blotting. A MT-CFP contém ligeiramente mais lipoarabinomanano do que a ST-CFP e quantidades mais elevadas de ESAT-6 estão presentes na ST-CFP. A análise ao ARNm para o INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 confirmou que a produção de INF- $\gamma$  estava reduzida em doentes com tuberculose pulmonar, sem qualquer aumento concomitante na produção de IL-4. Estes resultados mostram que variações ao longo do tempo de cultura do *M. tuberculosis* podem desencadear *in vitro* diferentes respostas imunitárias mediadas por células.

REV PORT PNEUMOL 2002; VIII (6): 629-643

**Palavras-chave:** Tuberculose (TB), proteínas filtradas de cultura, Proliferação linfocitária, Interferon- $\gamma$

## ABSTRACT

Blastogenic responses and cytokine production induced by two culture filtrates of *Mycobacterium tuberculosis* collected at different time points were compared in donors with pulmonary tuberculosis and healthy Mantoux-positive BCG vaccinated controls. The short term culture filtrate proteins (ST-CFP) induced stronger IFN- $\gamma$  production than the mid term culture filtrate proteins (MT-CFP), in both healthy BCG-vaccinated controls and patients with pulmonary tuberculosis, while the MT-CFP induced higher lymphocyte proliferation. Considerable heterogeneity was found within the healthy subjects, results indicated that chronic tuberculosis contacts elicited higher responses toward ST-CFP. Pulmonary tuberculosis donors demonstrated reduced proliferation and IFN- $\gamma$  production towards the antigen profiles when compared to the healthy subjects. The presence of ESAT-6, 10 kDa, 19 kDa, 30 kDa antigens of *M. tuberculosis* and lipoarabinomannan (LAM) were compared in both preparations using Western blotting. Although the MT-CFP contained slightly more lipoarabinomannan than the ST-CFP and higher quantities of the ESAT-6 was present in ST-CFP, there were no other obvious differences in the composition of the two culture filtrates. Analysis of mRNA for IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 confirmed that IFN- $\gamma$  production was reduced in patients with pulmonary tuberculosis without any concomitant increase in IL-4. These results show that variations in time of culture of *M. tuberculosis*, can elicit different cell-mediated immune responses *in vitro*.

REV PORT PNEUMOL 2002; VIII (6): 629-643

**Key-words:** Tuberculosis (TB), culture filtrate proteins, Lymphocyte proliferation, Interferon- $\gamma$

## INTRODUÇÃO

A protecção específica contra o *Mycobacterium tuberculosis* nos ratinhos é conferida pela inoculação de bactérias vivas, enquanto os microrganismos mortos aumentam predominantemente a resistência não específica<sup>1</sup>. Estas observações levam à hipótese de que os antigénios secretados, libertados durante a primeira fase do crescimento, podem conferir protecção. Além disso, as proteínas secretadas de *M. tuberculosis* presentes nos filtrados de tempo mais reduzido da cultura de *M. tuberculosis* (antes de ocorrer autólise significativa) são capazes de induzir uma população protectora de células T que tem a capacidade de conter a infecção inicial e mediar a resistência do hospedeiro<sup>2,3,4</sup>. Nos humanos, tem sido descrito que as proteínas secretadas são altamente imunogénicas e capazes de desencadear respostas proliferativas fortes, produção de INF- $\gamma$  e citotoxicidade mediada pelas células T CD4<sup>+</sup><sup>5,6</sup>. Os dados têm demonstrado que o antigénio ESAT-6 que está presente na ST-CFP se expressa no *M. tuberculosis*, mas se encontra ausente no *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) e na maioria das espécies micobacterianas ambientais investigadas<sup>7</sup>. Os estudos comparando as respostas imunitárias humanas ao ESAT-6 em regiões com baixa e alta endemicidade para a tuberculose demonstraram que uma frequência elevada (58 %) de etíopes saudáveis com contacto com doentes com tuberculose reconheciam o ESAT-6, enquanto apenas 2 dos 29 dinamarqueses em circunstâncias idênticas reconheciam esta molécula<sup>8</sup>.

As diferentes preparações de proteínas filtradas de cultura (PFC) podem ter propriedades diferentes, e a duração da cultura vai determinar a composição das PFC. A imunização de ratinhos com as primeiras PFC de *M. tuberculosis*, obtidas em dois tempos diferentes, mostrou um grau semelhante de protecção ao induzido pelo BCG vivo. Assim, ratinhos vacinados com uma preparação de PFC colhida após 1 semana de cultura — proteínas de curto prazo filtradas da cultura (ST-CFP) — deram origem a

uma população de células T CD4<sup>+</sup> de memória com uma vivência prolongada, ainda detectável 22 semanas após a inoculação<sup>2</sup>, enquanto a imunização com proteínas de médio prazo filtradas da cultura (MT-CFP) (colectadas após 2 semanas de cultura) não exibiam protecção após 5 meses<sup>4</sup>. O nosso estudo confirma o potencial imunogénico dos antigénios secretados e o seu papel nas respostas protectoras para o *M. tuberculosis* nos humanos. Demonstrámos que as PFC do *M. tuberculosis* colectadas em diferentes tempos de cultura, podem desencadear diferentes respostas celulares imunes *in vitro*, podendo estas estarem directamente relacionadas com os mecanismos de protecção imunológica contra o *M. tuberculosis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Dadores

Este estudo incluiu 60 dadores portugueses, consistindo em 30 dadores controlo e 30 doentes com tuberculose pulmonar (TB). Os indivíduos incluídos no estudo tinham idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos (idade média  $\pm$  desvio padrão, 35,1  $\pm$  11,2) e eram seronegativos para o VIH-1 e 2. O sangue dos doentes com tuberculose foi colhido num único tempo antes ou dentro de 2 semanas do início da quimioterapia antimicobacteriana. Foi obtido um consentimento informado e o protocolo foi aprovado pela comissão de ética local. Tanto os controlos como os doentes apresentavam uma proveniência étnica semelhante. O grupo controlo incluía indivíduos portugueses saudáveis, vacinados com a BCG, Mantoux positivos (induração  $\geq$ 5mm), residentes em Lisboa, Portugal, e sem história prévia de tuberculose pulmonar. Dentro deste grupo existiam controlos saudáveis com contacto crónico com tuberculose (n=16) que apresentavam uma história de cinco ou mais anos de trabalho numa enfermaria de doenças infecciosas, com exposição diária a doentes com

tuberculose. Outro grupo dentro dos controlos saudáveis (n=14) não tinham história prévia de contacto com doentes com tuberculose. Não havia história de tuberculose nos membros da sua família e estes indivíduos nunca tinham sido hospitalizados.

Os doentes com tuberculose pulmonar foram recrutados do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Serviço de Pneumologia e Serviço de Medicina II do Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal; Pneumologia IV do Hospital Pulido Valente, Lisboa, Portugal, e do Hospital Dr. José Maria Antunes Júnior, Torres Vedras, Portugal. A maioria dos indivíduos (85 %) envolvidos neste estudo tinha sido vacinada com *M. bovis* BCG. A tuberculose pulmonar foi diagnosticada por radiografia ao tórax e confirmada por exame directo e/ou cultura de expectoração, secreções brônquicas ou lavado broncoalveolar.

### Antigénios

O derivado de proteína purificado (PPD), lote RT44, foi adquirido ao Statens Serum Institute (Copenhaga, Dinamarca) e utilizado numa concentração final de 10 µg/ml. A ST-CFP do *M. tuberculosis* H37Rv (1 semana de cultura) foi gentilmente cedida pelo Dr. P. Andersen, Statens Serum Institute, Copenhaga. A MT-CFP do *M. tuberculosis* H37Rv (2 semanas de cultura) foi gentilmente cedida pelo Dr. J. Belisle (Colorado State University, USA). As duas PFC foram utilizadas numa concentração final de 5 µg/ml. Os antigénios foram todos testados de modo a determinar a concentração óptima para o uso. O mitogénio fitohemaglutinina (PHA) (Difco, Detroit Michigan, USA) foi usado como controlo positivo na concentração final de 8 µg/ml (dados não mostrados).

### Teste de linfoproliferação

As células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) isoladas do sangue heparinizado por gradiente de densidade. Os ensaios foram efectuados

como descrito por Silveira *et al*<sup>9</sup>. As células foram estimuladas com PPD, ST-CFP, MT-CFP e com o PHA como controlo positivo. A radioactividade incorporada foi medida num contador de radiações LS6500 (Beckman)<sup>TM</sup>, sendo expressa em contagens por minuto (cpm). Os resultados das proliferações linfocitárias foram expressos como a média em cpm dos testes em triplicado menos a média em cpm das células cultivadas sem antigénio ( $\Delta$ cpm).

### Produção de citocinas

A quantidade de INF- $\gamma$  presente na cultura foi analisada por testes de ELISA comercial (PharMingen, San Diego, CA, USA). Os sobrenadantes foram colectados no dia 6, armazenados a -20°C e analisados mais tarde, de acordo com as instruções do fabricante.

### Expressão de citocinas no ARNm das CMSP

As CMSP ( $2 \times 10^6$ /ml) foram colocadas em placas de 24 poços e estimuladas com PPD, *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* vivo H37Rv ou PHA. Foi obtida uma relação óptima de 1 bactéria para 4 monócitos. Os ensaios foram efectuados como descrito por Silveira *et al*<sup>7</sup>. Resumidamente, as células foram colectadas após 24 horas em cultura, centrifugadas, ressuspendidas em ARNzol B (Biogenesis, Poole, UK)<sup>TM</sup> e armazenadas a -70°C. O ARN foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. O ADN complementar (ADNc) foi sintetizado utilizando aproximadamente 1 µg de ARN num total de 30 µl. O ADNc obtido foi amplificado por Reacção em Cadeia da Polimerase (RCP) utilizando sequências iniciadoras de INF- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e  $\beta$ -actina adquiridos à Clontech (Palo Alto, CA, USA). A amplificação por RCP foi efectuada num termociclador Techne PHC-3 para 28 (INF- $\gamma$ ), 30 (IL-4), 33 (IL-10) e 34 (G3DPH) ciclos de desnaturação a 94°C durante 1

minuto, com uma hibridação a 60°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 3 minutos. Os produtos de RCP (5 µl) foram corridos em gel de agarose a 1 % e a presença de produtos específicos de RCP foi visualizada através de luz ultravioleta.

### **Análise por *western blot***

MT-CFP e ST-CFP foram fervidas durante 5 minutos num tampão contendo dodecilsulfato de sódio 0,1 % (SDS), 2-mercaptoetanol 0.143 M, glicerol a 10 % em tampão Tris-HCL 50 MM (pH 6.8) e submetidas a uma electroforese em gel de poliacrilamida-SDS usando acrilamida a 12 % para análise proteica e acrilamida a 15 % para a detecção de lipoarabinomanano (LAM) (utilizando um minigel padrão da BioRad™). Após a electroforese, o gel foi submetido a uma análise por *western blot*<sup>10</sup> utilizando anticorpos policlonais e monoclonais específicos para o LAM (CS-35) e antigénios proteicos de *M. tuberculosis* com peso molecular (p.m.) de 30 kDa (K--92), 19 kDa (Hyt 6), 10 kDa (CS-01) e 6 kDa (HyB 76). As proteínas foram transferidas para nitrocelulose e a membrana foi posteriormente incubada com anticorpo durante 1 hora à temperatura ambiente após o bloqueio com Albumina Sérica Bovina (ASB) a 2,5 % em TBS-T (Tampão Tris salino + Tween 20). Os *western blots* foram então revelados com um segundo anticorpo (IgG anti-coelho ou IgG anti-ratinho) conjugado com peroxidase de rabanete utilizando os reagentes de detecção do kit ECL *western blotting* (Amersham Life Sciences™).

### **Análise estatística**

Os dados são apresentados usando os valores médios de amostras e ensaios em duplicado. Foi utilizado um método não paramétrico, teste Mann-Whitney U, que não concluiu sobre a distribuição subjacente, e a normalidade dos dados foi usada para estabelecer

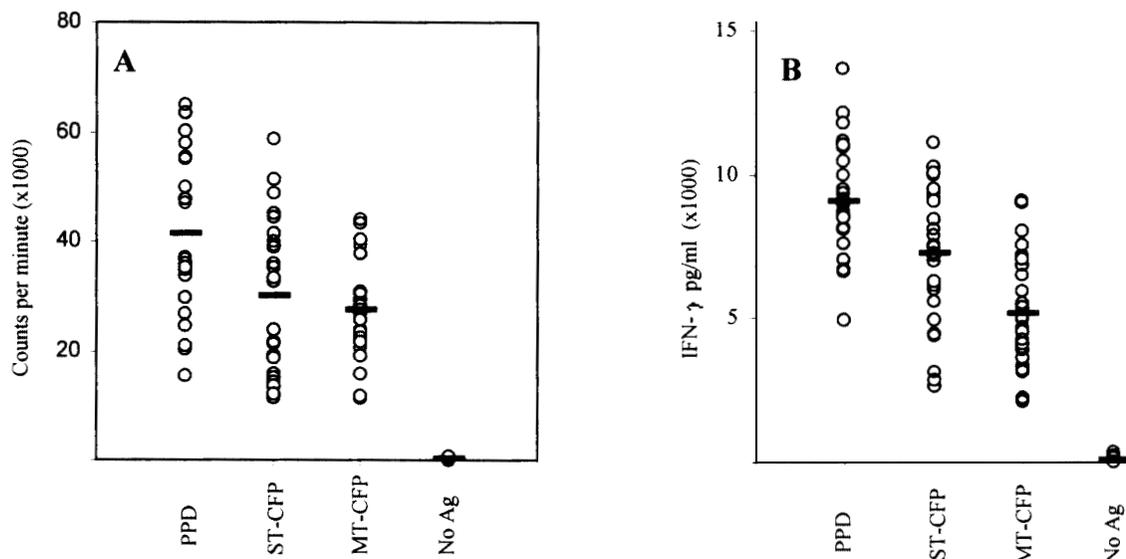
significância estatística entre grupos de dados. As correlações entre conjuntos de dados foram calculadas através do teste de correlação de Spearman.

## **RESULTADOS DOS TESTES IMUNOLÓGICOS**

### **Proliferação e respostas de INF-γ em dadores saudáveis**

As respostas proliferativas de dadores saudáveis são apresentadas na Fig. 1A. A análise dos resultados de indivíduos saudáveis vacinados com a BCG demonstra que os dadores são capazes de montar uma forte resposta em relação ao painel de antigénios. As respostas proliferativas de dadores saudáveis mostraram uma proliferação superior em resposta ao PPD, intermédia às ST-CFP e inferior às MT-CFP. As maiores diferenças foram encontradas quando se comparou o PPD com as ST-CFP e as MT-CFP e estas diferenças foram estatisticamente significativas (teste de Mann-Whitney U, p=0,009; p=0,000). Não se verificaram diferenças significativas entre a linfoproliferação induzida pelas ST-CFP e pelas MT-CFP (teste de Mann-Whitney U, p=0,647). As respostas induzidas nos dadores controlo foram variadas e foi evidente que existiam dois grupos de resposta dentro deste grupo, nomeadamente respostas elevadas e respostas mais baixas.

Todas as três preparações PPD, ST-CFP e MT-CFP foram capazes de induzir a produção de INF-γ nos dadores saudáveis (n = 30) (Fig. 1B). A produção de INF-γ foi mais alta em relação ao PPD, seguida pelo ST-CFP e MT-CFP. As respostas de INF-γ mostraram um padrão semelhante às respostas proliferativas. No entanto, as ST-CFP induziram respostas significativamente mais altas em comparação com as MT-CFP (teste de Mann-Whitney U, p = 0,000). A produção de INF-γ também resultou numa diferença estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney U, p = 0,000) entre a resposta evocada por cada preparação. A



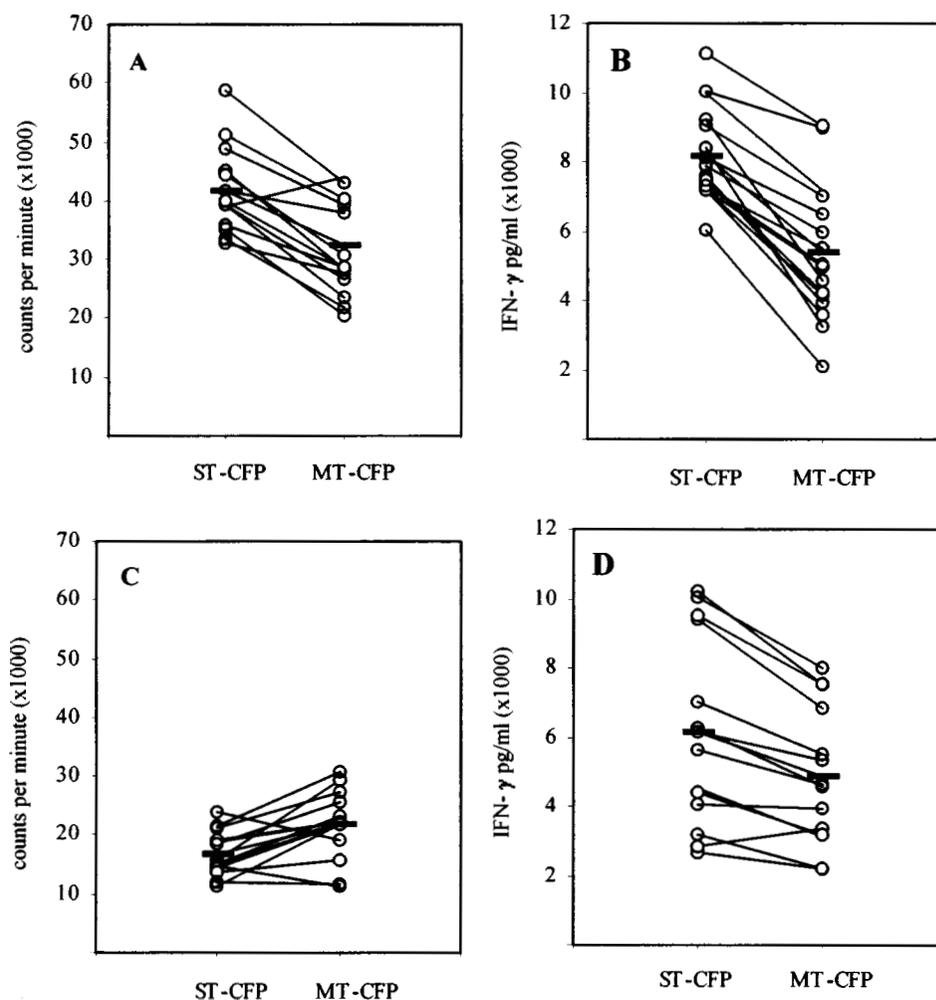
**Fig. 1 – Respostas proliferativas e produção de INF- $\gamma$  pelas CMSP de dadores saudáveis de controlo (n=30).** As CMSP de dadores saudáveis de controlo foram incubadas com PPD, proteínas de curto prazo filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (ST-CFP), proteínas de médio prazo filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (MT-CFP) e células não estimuladas (No Ag) durante 7 dias e foi quantificada a linfoproliferação (Fig. 1A) e a produção de INF- $\gamma$  (Fig. 1B).

variação entre a capacidade das CMSP dos dadores individuais para produzir INF- $\gamma$  foi evidente.

### Caracterização de dadores saudáveis

Para definir melhor uma resposta normal induzida pelo painel de antígenos, foram avaliados os padrões de magnitude de linfoproliferação (Fig. 2A, C) e as respostas de INF- $\gamma$  (Fig. 2B, D) às ST-CFP e MT-CFP em indivíduos com cinco ou mais anos de contacto clínico com doentes com tuberculose infecciosa (n=16) (Fig. 2A, B) e indivíduos sem história prévia de contacto com tuberculose (n=14) (Fig. 2C, D). A produção de INF- $\gamma$  de contactos crónicos com tuberculose mostrou valores máximos de INF- $\gamma$  para as ST-CFP. Os contactos crónicos com tuberculose demonstraram valores significativamente mais elevados de proliferação (Fig. 2A) (teste de Mann-Whitney U, p = 0,000) e de INF- $\gamma$  (Fig. 2B) (teste de Mann-Whitney U, p = 0,025) para

as ST-CFP quando comparados com os controlos saudáveis sem contacto com tuberculose. Os indivíduos saudáveis com contacto crónico com doentes com tuberculose demonstraram uma proliferação significativamente aumentada para as MT-CFP (teste de Mann-Whitney U, p = 0,002) mas não existiam nenhuma diferença na produção de INF- $\gamma$  (teste de Mann-Whitney U, p = 0,480) quando comparados com controlos saudáveis sem contacto com tuberculose. Também foi evidente que os indivíduos que não estiveram em contacto crónico com doentes com tuberculose mostraram um aumento da proliferação média para as MT-CFP em vez das ST-CFP, tal como no grupo de controlos com contacto crónico com tuberculose. No entanto, esta tendência não foi aparente em dadores sem contacto com tuberculose no que diz respeito à produção de INF- $\gamma$  em relação às MT-CFP. Para além destes achados, os níveis de INF- $\gamma$  produzidos como resposta aos antígenos não se correlacionaram com os níveis de proliferação estimulada pelos mesmos antígenos.



**Fig. 2** – Respostas proliferativas e produção de INF- $\gamma$  pelas CMSP de dadores saudáveis de controlo com contacto crónico com tuberculose (n=14). As CMSP de dadores saudáveis de controlo foram incubadas com proteínas de curto prazo filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (ST-CFP) e proteínas de prazo intermédio filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (MT-CFP) durante 7 dias e foi quantificada a linfoproliferação (Fig. 2A, C) e a produção de INF- $\gamma$  (Fig. 2B, D).

Deve ser realçado que embora os controlos com contacto crónico com tuberculose não mostrassem evidência de infecção tuberculosa pela análise das radiografias e ausência de sintomas ou sinais clínicos, permanece a possibilidade teórica e remota de que alguns indivíduos poderiam eventualmente ter uma infecção tuberculosa aguda. Após 2 anos deste estudo nenhum dos indivíduos estudado relatou qualquer evidência de tuberculose clínica.

### Respostas proliferativas em doentes com tuberculose

O mesmo painel de antígenos foi usado para testar a capacidade que os doentes com tuberculose pulmonar (n=30) apresentam para montar uma resposta proliferativa e de produção de INF- $\gamma$ . As respostas desencadeadas nos doentes com tuberculose (n=30) foram comparadas com a dos dadores

saudáveis (aqueles que desenvolveram o que foi definido como uma resposta normal). A análise dos resultados de controlos saudáveis vacinados com a BCG sugere que estes indivíduos podem ser subdivididos ainda em dois grupos de controlos com contacto crónico com tuberculose com exposição prévia provável ao *M. tuberculosis* e indivíduos sem história de contacto com tuberculose. A capacidade das CMSP de doentes com tuberculose para proliferarem foi comparada com a dos controlos saudáveis com e sem contacto crónico com tuberculose. Os doentes com tuberculose pulmonar (Fig. 3C) mostraram uma proliferação média reduzida em relação a todos os antígenos quando comparados com o grupo com (Fig. 3A) e sem contacto crónico (Fig. 3B). Os doentes com tuberculose mostraram uma resposta significativamente reduzida em relação ao PPD, ST-CFP e MT-CFP (teste de Mann-Whitney U,  $p = 0,000$ ;  $p = 0,000$ ;  $p = 0,000$ ) em comparação com os contactos crónicos. Os indivíduos saudáveis sem contacto crónico com doentes com tuberculose demonstraram uma resposta significativamente aumentada em relação ao PPD e MT-CFP (teste de Mann-Whitney U,  $p = 0,001$ ;  $p = 0,000$ ), mas não foi evidente nenhuma diferença em relação às ST-CFP (teste de Mann-Whitney U,  $p = 0,062$ ). Os doentes com tuberculose (Fig. 3C) mostraram um padrão semelhante de resposta antígeno em relação aos controlos saudáveis com contacto crónico com tuberculose. No entanto, controlos com contacto crónico com tuberculose mostraram uma resposta polarizada em relação ao painel de antígenos micobacterianos e existiram dois grupos de resposta, nomeadamente respostas elevadas e respostas baixas. A existência de alguma sobreposição das respostas nos controlos com tuberculose que respondem de um modo baixo e nos dadores sem contacto não foi evidente.

### Respostas de interferão-gama nos doentes com tuberculose

A produção de INF- $\gamma$  em resposta ao painel de antígenos nos doentes com tuberculose mostrou uma

produção média de INF- $\gamma$  reduzida em relação a todos os antígenos quando comparada com o grupo controlo (Fig. 4A, B). As CMSP de doentes com tuberculose induziram quantidades significativamente diminuídas de INF- $\gamma$  (Fig. 4C) quando estimuladas com PPD (teste de Mann-Whitney U,  $p = 0,001$ ) e MT-CFP (teste de Mann-Whitney U,  $p = 0,000$ ), mas não para as ST-CFP (teste de Mann-Whitney U,  $p = 0,246$ ), quando comparadas com as dos controlos saudáveis sem contacto com tuberculose. O baixo nível de produção de INF- $\gamma$  pode ter sido devido a uma ausência de células no sangue periférico, redução de células específicas para o *M. tuberculosis* ou uma incapacidade destas células em produzir INF- $\gamma$  como resposta a um estímulo. Nos dados mostrados é evidente que a proliferação das CMSP e a secreção de citocinas como resposta a todos os antígenos é extremamente heterogênea.

### Expressão de citocinas no ARNm pelas CMSP

Para uma melhor caracterização das diferenças nas respostas alvo às ST-CFP e às MT-CFP, foi estudada a expressão de ARNm do INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, utilizando RT-RCP específico para citocinas. A expressão de ARNm para o INF- $\gamma$  foi observada na maioria dos controlos ou doentes quando as CMSP foram estimuladas com ST-CFP (9/12 e 7/12 respectivamente) (Quadro I). As MT-CFP foram menos eficazes para desencadear a resposta de INF- $\gamma$  nos controlos (5/12) ou nos doentes com tuberculose (4/12), o que coincide com os resultados de produção de INF- $\gamma$  obtidos por ELISA. A expressão de IL-4 foi apenas observada num dador controlo. A expressão do ARNm da IL-10 foi observada na maioria dos doentes com tuberculose (10/12) e dos indivíduos controlo (10/12) como resposta às ST-CFP.

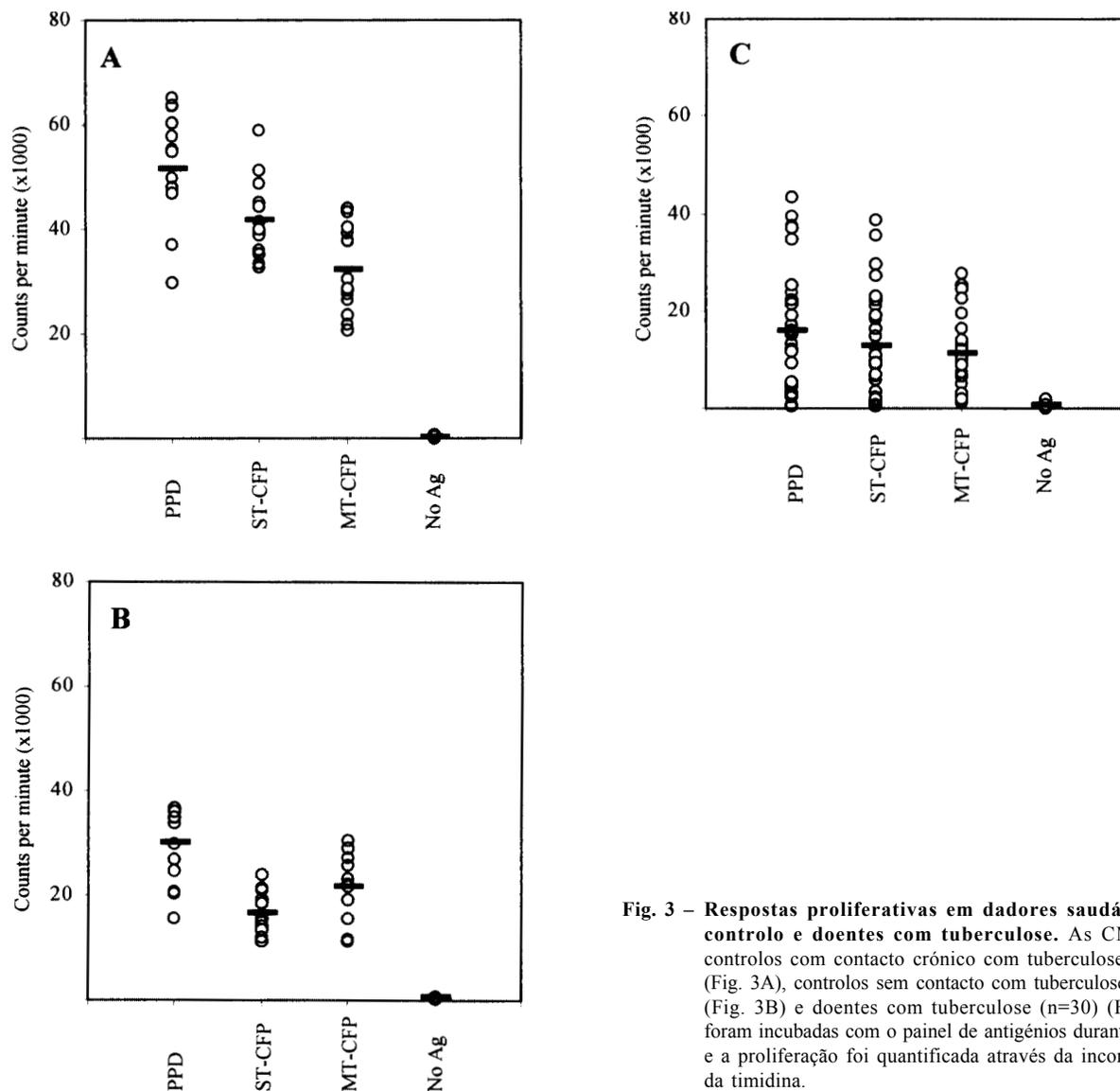


Fig. 3 – Respostas proliferativas em dadores saudáveis de controlo e doentes com tuberculose. As CMSP de controlos com contacto crónico com tuberculose (n=16) (Fig. 3A), controlos sem contacto com tuberculose (n=14) (Fig. 3B) e doentes com tuberculose (n=30) (Fig. 3C) foram incubadas com o painel de antígenos durante 7 dias e a proliferação foi quantificada através da incorporação da timidina.

### Perfil immunoblot das PFC

Para uma melhor compreensão do contraste nas respostas desencadeadas pelas ST-CFP e MT-CFP, foi investigada a composição das ST-CFP e MT-CFP utilizando uma metodologia por Western Blot. A presença de todos os antígenos testados foi observada na composição dos dois filtrados da cultura (Fig. 6). O antígeno ESAT-6 (6 kDa) encontrava-se presente em quantidades mais

elevadas nas ST-CFP do que nas MT-CFP, e o oposto foi observado para todos os outros antígenos (10 kDa, 19 kDa, 30 kDa) e para o LAM (dados não mostrados).

### DISCUSSÃO

Neste estudo foram quantificados o grau da proliferação e a produção de  $INF-\gamma$  gerada pelo PPD,

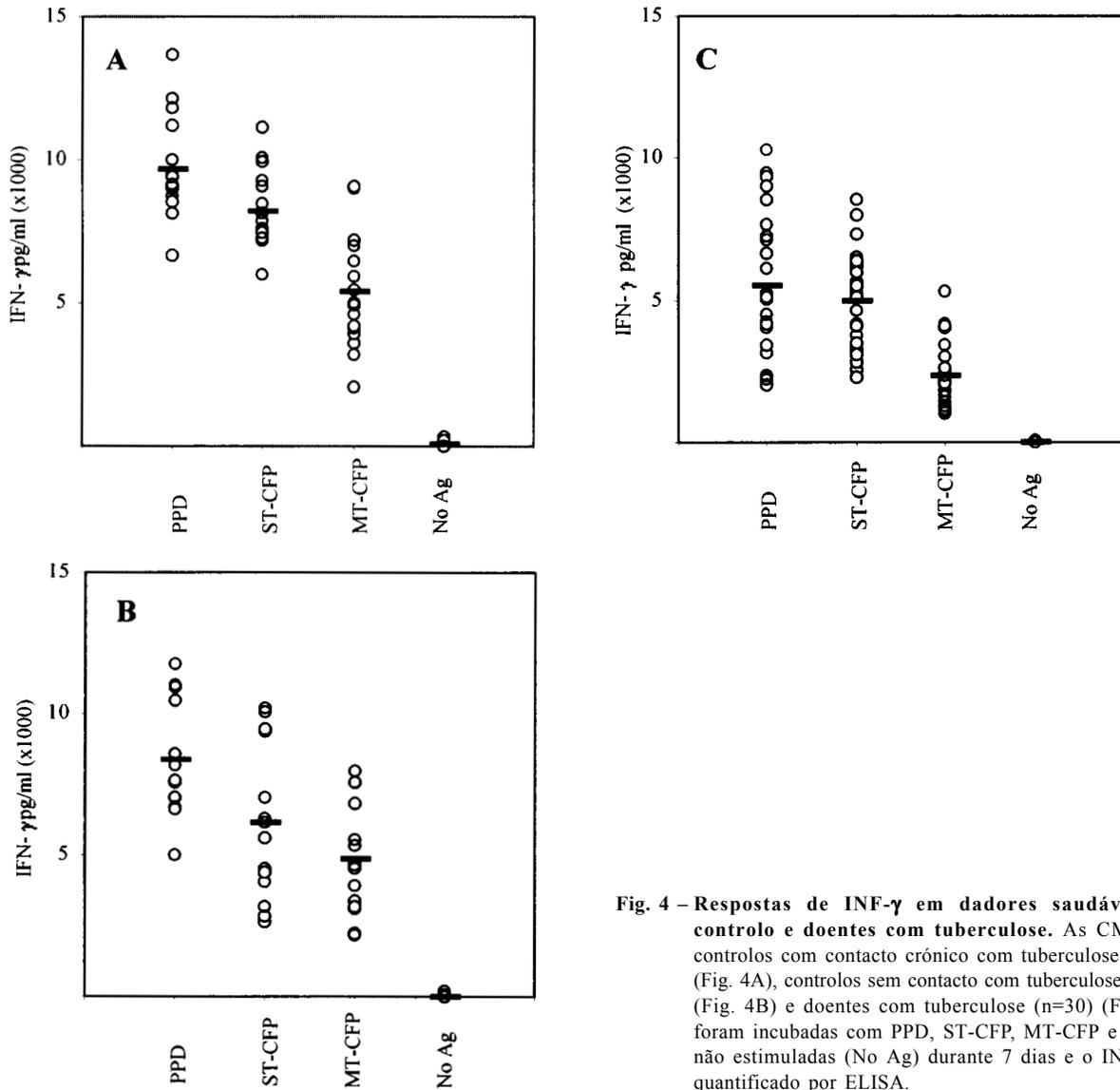


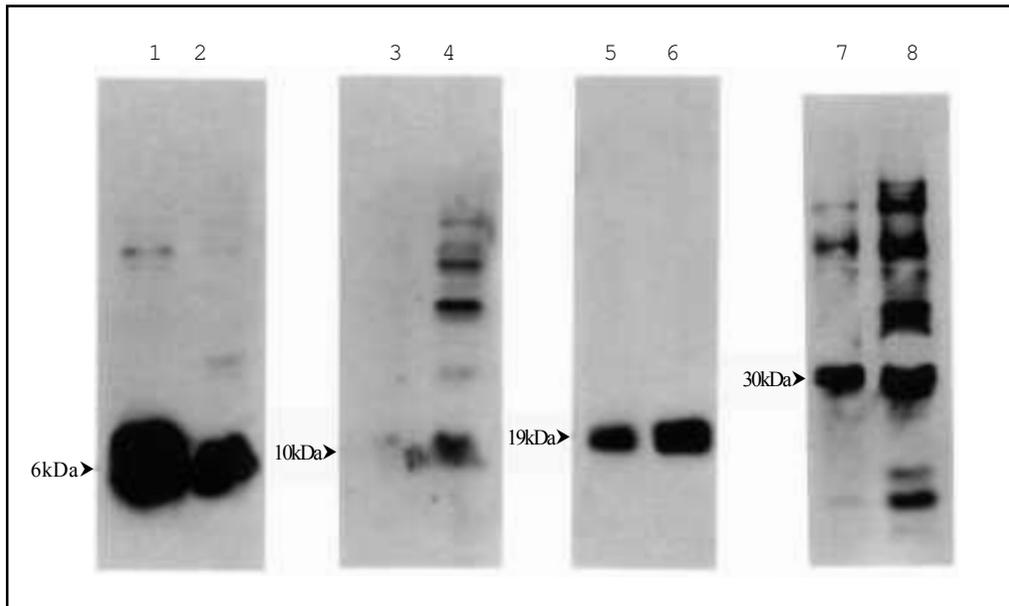
Fig. 4 – Respostas de INF- $\gamma$  em dadores saudáveis de controlo e doentes com tuberculose. As CMSP de controlos com contacto crónico com tuberculose (n=16) (Fig. 4A), controlos sem contacto com tuberculose (n=14) (Fig. 4B) e doentes com tuberculose (n=30) (Fig. 4C) foram incubadas com PPD, ST-CFP, MT-CFP e células não estimuladas (No Ag) durante 7 dias e o INF- $\gamma$  foi quantificado por ELISA.

**QUADRO I**

**Expressão do ARNm para o INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10.**

Os resultados são representados como o número de indivíduos com expressão do ARNm das citocinas/número total de indivíduos estudados

	INF- $\gamma$			IL-4			IL-10		
	PPD	ST-CFP	MT-CFP	PPD	ST-CFP	MT-CFP	PPD	ST-CFP	MT-CFP
Controlos	8/12	9/12	5/12	1/12	1/12	0/12	7/12	10/12	7/12
Doentes com tuberculose	5/12	7/12	4/12	0/12	0/12	0/12	5/12	10/12	9/12



**Fig. 5 – Perfil immunoblot dos filtrados de cultura.** Linhas 1, 3, 5, e 7, proteínas de curto prazo filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (ST-CFP); linhas 2, 4, 6 e 8, proteínas de médio prazo filtradas da cultura de *M. tuberculosis* (MT-CFP). Todas as linhas foram carregadas com o equivalente a 5 µg de proteína. Os western blots foram revelados utilizando anticorpo policlonal para o antígeno de 6 kDa (HyB 76, linha 1 e 2); antígeno de 10 kDa (CS-01, linha 3 e 4); anticorpos monoclonais específicos para o antígeno de 19 kDa (Hyt 6, linha 5 e 6); antígeno de 30 kDa (K-92, linha 7 e 8).

ST-CFP e MT-CFP de *M. tuberculosis* em dadores controlo saudáveis e indivíduos diagnosticados com tuberculose. Os dadores saudáveis vacinados com BCG foram ainda subdivididos em contactos crónicos com tuberculose e sem contacto. A diferença nas respostas derivadas de contactos crónicos com tuberculose e sem contacto pode representar os factores protectores ou prejudiciais da probabilidade que um indivíduo tem em controlar uma infecção por *M. tuberculosis*. As respostas de doentes com tuberculose podem indicar quais os aspectos do sistema imunitário que não foram adequados para conter a infecção inicial com *M. tuberculosis*. A comparação de respostas nestes grupos pode permitir uma melhor compreensão acerca das diferenças das funções imunitárias, que podem contribuir para a capacidade de um indivíduo em progredir para uma tuberculose activa ou pelo contrário em ter capacidade para conter essa infecção primária.

A relação entre a susceptibilidade de um indivíduo para a tuberculose e a resposta imunitária do hospedeiro ainda não se encontra esclarecida. Isto salienta a importância de definir uma resposta imunitária humana saudável dentro da população em estudo. Os resultados apresentados demonstraram que os contactos crónicos com tuberculose têm uma maior magnitude de resposta em relação ao painel de antígenos. As CMSP de contactos com tuberculose induziram uma proliferação significativamente superior e produção de INF- $\gamma$  em relação ao PPD e ST-CFP em comparação com os não contactos. No entanto, indivíduos com exposição crónica a doentes com tuberculose demonstraram uma proliferação significativamente superior em relação ao MT-CFP, mas não foram evidentes diferenças significativas na produção de INF- $\gamma$  em comparação com os não contactos. De um modo geral, os dadores saudáveis, que demonstraram uma forte resposta proliferativa

em relação ao painel de antígenos, também mostraram uma boa produção de INF- $\gamma$ , mas sem correlação entre as respostas proliferativas e a produção de INF- $\gamma$ . Isto indica que estes indivíduos com contacto com os bacilos podem ter estado infectados com *M. tuberculosis* mas montaram uma resposta imunitária protectora e permaneceram clinicamente saudáveis. Embora no momento do ensaio os contactos crónicos com tuberculose possam estar a desenvolver uma infecção tuberculosa aguda que não tenha sido possível detectar por radiografia, essa possibilidade é teórica e remota, pela inexistência de sintomas ou sinais clínicos, e porque após 2 anos não existiu evidência de tuberculose clínica nestes indivíduos. Além disso, a maior proliferação e produção de INF- $\gamma$  pelos contactos crónicos com tuberculose em relação ao ST-CFP está de acordo com o pressuposto de sensibilização ao *M. tuberculosis*, uma vez que o antígeno ESAT-6, o qual se encontra presente nas ST-CFP, está expresso no *M. tuberculosis* mas se encontra ausente no *Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin (BCG) e na maioria das outras espécies micobacterianas ambientais<sup>7</sup>.

O ESAT-6 é um indutor poderoso de INF- $\gamma$  nos ratinhos e em humanos<sup>2,5</sup>. Logo, a resposta mais forte de INF- $\gamma$  em relação às ST-CFP em comparação com as MT-CFP pode encontrar-se relacionada com a maior quantidade de ESAT-6 nas ST-CFP ou com a menor quantidade de LAM. No entanto, esta proteína não é provavelmente a única responsável pela forte produção de INF- $\gamma$  observada nas CMSP estimuladas com ST-CFP. O gene ESAT-6 no *M. bovis* BCG está deletado e ausente e, deste modo, a vacinação com BCG não deve ser responsável pela indução de resposta nos contactos crónicos com tuberculose<sup>7</sup>. O LAM, o qual está presente em grandes quantidades na preparação de MT-CFP, suprime a proliferação de células T induzida por antígenos através da interferência com a função de células apresentadoras de antígeno<sup>11</sup>, o que poderia ter afectado as respostas às MT-CFP. Estas preparações contêm um grande número de componentes,

como mostrado pela existência de mais de 200 proteínas na MT-CFP através da análise bidimensional do gel<sup>12</sup>, e uma vez que a análise por *western blotting* apenas conseguiu estabelecer a presença de um pequeno número de antígenos conhecidos, seria interessante investigar melhor os antígenos das ST-CFP e MT-CFP que são responsáveis por induzirem a produção de INF- $\gamma$ , uma vez que esses antígenos podem representar um papel importante na imunidade protectora contra a tuberculose. No modelo de tuberculose em ratinhos, Orme<sup>13</sup> propôs que existem duas fases de resposta à infecção por *M. tuberculosis*, sendo a primeira caracterizada por células T CD4+ que segregam grandes quantidades de INF- $\gamma$ , seguida pela emergência de células T citolíticas, particularmente do fenótipo CD4+, também expressando INF- $\gamma$ , embora em menores quantidades, e células T CD4+ de memória que persistem mais tempo. Deve ser tido em consideração que as duas preparações de filtrados de cultura utilizadas neste estudo não foram preparadas no mesmo laboratório, podendo por isso existir uma conseqüente variação na composição, dependente das condições de cultura e do tempo de colheita, o que pode afectar os resultados obtidos neste estudo.

De um modo geral, os doentes saudáveis com exposição intensa a doentes com tuberculose com doença activa mostraram uma blastogénese e uma produção de INF- $\gamma$  superior não apenas em relação às ST-CFP mas também ao PPD. Isto indica que indivíduos com um prévio contacto foram capazes de reconhecer rapidamente os antígenos micobacterianos e de que as suas células podem proliferar e produzir INF- $\gamma$  em maiores concentrações contra antígenos do *M. tuberculosis*. As respostas observadas nos contactos crónicos sugerem que estes indivíduos mostram uma provável resposta protectora contra o *M. tuberculosis*, pois embora tivessem tido mais de cinco anos de contacto próximo com doentes com tuberculose, estes indivíduos permaneceram saudáveis. Em Portugal, devido à alta prevalência de tuberculose, os indivíduos no grupo sem contacto também podem ter tido uma exposição prévia ao *M.*

*tuberculosis*, como indicado por alguma sobreposição entre os bons respondedores neste grupo e o grupo previamente sensibilizado pelo contacto. A falta de um parâmetro laboratorial consistente de correlação da protecção nos humanos torna mais premente a urgente necessidade de uma futura clarificação das respostas imunitárias responsáveis pela destruição dos bacilos inalados.

Os doentes com tuberculose pulmonar demonstraram uma reduzida proliferação em relação ao painel de antígenos, em comparação com os dadores saudáveis. Os doentes mostraram reduções estatisticamente significativas na proliferação das CMSP e na produção de INF- $\gamma$  em relação ao PPD, ST-CFP e MT-CFP, comparando com os dadores sensibilizados. Os doentes com tuberculose demonstraram uma redução significativa da proliferação e da produção de INF- $\gamma$  em relação ao PPD e MT-CFP, mas não ao ST-CFP em comparação com os dadores não sensibilizados. A diminuição da capacidade dos doentes com tuberculose de responder ao painel de antígenos pode dever-se ao sequestro de células no local de infecção ou, mais provavelmente, a factores immunosuppressivos. De um modo geral, as respostas desencadeadas pelos doentes com tuberculose encontravam-se deprimidas quando comparadas com as obtidas nos dadores saudáveis, embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas em relação às obtidas com as ST-CFP no grupo sem contacto, talvez devido à ausência de uma prévia exposição a este antígeno. Além disso, a falta de uma redução estatisticamente significativa na resposta proliferativa e de produção de INF- $\gamma$  em relação às ST-CFP, nos doentes, pode ter sido devida a uma resposta aumentada às ST-CFP, uma vez que os doentes incluídos neste estudo não apresentavam nenhuma ou apenas 2 semanas de quimioterapia antimicobacteriana. Uma explicação alternativa seria a de que os doentes responderam de uma forma mais marcada aos antígenos expressos por todo o *M. tuberculosis* vivo.

Os resultados deste estudo mostraram que as respostas de INF- $\gamma$  no grupo de sujeitos saudáveis

em geral foram estatisticamente mais elevadas em relação ao PPD, ST-CFP e MT-CFP, em comparação com os doentes com tuberculose. A incapacidade dos doentes com tuberculose de produzir INF- $\gamma$  em relação ao PPD substantia os dados obtidos noutros estudos, os quais mostraram que a produção de INF- $\gamma$  pelas CMSP estimuladas com PPD, *M. tuberculosis* H37Rv ou estirpes de Erdman, estava reduzida quando comparada com a dos indivíduos saudáveis vacinados com a BCG<sup>14, 15, 16</sup>. A incapacidade das células de indivíduos com tuberculose activa para proliferarem e produzirem INF- $\gamma$  de forma adequada como resposta ao PPD e ST-CFP pode ser devida a uma diminuição da capacidade de apresentação do antígeno pelo macrófago e activação de mediadores de supressão. Estudos têm apontado que as células T de memória e não virgens (*naïve*) proliferam em resposta aos antígenos do *M. tuberculosis* e produzem INF- $\gamma$ <sup>17</sup>, o que por sua vez pode aumentar a actividade antimicobacteriana e a immunossupressão. Foi sugerido que o excesso de produção de TGF- $\beta$  pode contribuir para reduzir a expressão do receptor da IL-12 resultando numa produção de INF- $\gamma$  diminuída em doentes com tuberculose<sup>18</sup>.

A produção de INF- $\gamma$  em resposta à estimulação com o painel de antígenos foi independente da proliferação celular tanto nos dadores controlo como nos doentes com tuberculose. Esta observação sugere que todas as células, que proliferam, podem não ter produzido INF- $\gamma$ , ou apenas subtipos específicos se encontram a responder aos estímulos. É evidente que numa população de células T englobando todos os subtipos é pouco provável que qualquer correlação possa ser demonstrada sem que seja efectuada uma melhor caracterização das respostas de subtipos individuais de células T.

Em conclusão, este estudo demonstrou que os indivíduos do grupo controlo com contacto crónico com tuberculose apresentavam uma elevada proliferação e resposta de INF- $\gamma$  em relação ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo quando comparados com os indivíduos saudáveis não sensibilizados. Os doentes com tuberculose pulmonar evidenciaram uma

capacidade significativamente reduzida para produzir INF- $\gamma$  em relação ao painel de antigénios. O nosso estudo mostra que as proteínas filtradas da cultura de *M. tuberculosis* têm um grande potencial imunogénico e confirma o seu papel nas respostas protectoras ao *M. tuberculosis*. No entanto, este estudo sugere ainda que as variações ao longo do tempo de cultura podem conferir propriedades estimuladoras diferentes. É evidente que os indivíduos deste estudo demonstraram diferentes níveis de respostas em relação ao PPD e ST-CFP, o que pode indicar que o BCG confere diferentes graus de protecção contra a tuberculose, o que pode ser dependente da história imunitária do hospedeiro. No entanto, a importância da preparação de ST-CFP nos indivíduos incluídos neste estudo e que estão vacinados com o BCG é limitada pela não existência de um indicador mensurável que avalie a vacinação ou diagnóstico da infecção tuberculosa activa. A elevada variedade de respostas às ST-CFP demonstrada pelos contactos crónicos com tuberculose dentro do grupo de dadores controlo sugere uma sensibilização prévia pelo contacto com *M. tuberculosis*, no entanto não consegue distinguir entre doença activa, vacinação com BCG ou sensibilização cruzada por outras espécies de *Mycobacterium*.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Dr. P. Andersen, Statens Serum Institute, Copenhagen, e ao Dr. J. Belisle, Colorado State University, USA, por gentilmente terem fornecido as proteínas filtradas da cultura de *M. tuberculosis*. Gostaríamos de agradecer aos seguintes serviços e pessoal médico por terem fornecido as amostras dos doentes: Dr. Kamal Mansinho (director), Dr. Carlos Araújo, Dr. Jaime Nina e Dr. Fernando Borges, do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias; Dr.<sup>a</sup> Margarida Cancela de Abreu e à sua equipa do Serviço de Pneumologia; Dr. José Pimenta da Graça, Dr.<sup>a</sup> Sílvia Sousa e Dr.<sup>a</sup> Maria Francisca Moraes, do Serviço de Medicina II; Sr.<sup>a</sup> Luísa Pinto e Sr.<sup>a</sup> Augusta Teixeira, da Unidade de Citometria de Fluxo, do Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal; Dr. Jaime Pina e Dr.<sup>a</sup> Maria Jesus Valente, do

Serviço de Infecto-Respiratório — Unidade de Tuberculose, Hospital Pulido Valente, Lisboa, Portugal; e Dr.<sup>a</sup> Ana Barbado (directora) e Dr.<sup>a</sup> Natália André, do Hospital Dr. José Maria Antunes Júnior, Barro, Torres Vedras, Portugal. Gostaríamos de agradecer à nossa instituição promotora, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais (CMDT/IHMT/UNL) por providenciar apoio administrativo; ao departamento de Microbiologia do IHMT por providenciar apoio logístico laboratorial e ao Prof. J. Atouguia, do departamento de Clínica de Doenças Tropicais, por providenciar um gabinete de trabalho. Este trabalho foi financiado pelo projecto da JNICT (PBIC/S/SAU/1549/92), da Comissão Europeia (TS3-CT93-0245) e Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA (001074). Diane Ordway teve uma bolsa para Doutoramento da PRAXIS XXI BD/9003/96.

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais e na *London School of Hygiene & Tropical Medicine*.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ORME IM: Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1988; 140:3589.
2. ANDERSEN P: Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994; 62:2536.
3. ORME IM, MILLER ES, ROBERTS AD *et al*: T-lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol* 1992; 148:189.
4. ROBERTS AD, SONNENBERG MG, ORDWAY DJ *et al*: Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immun* 1995; 85:502.
5. BOESEN H, JENSEN BN, WILCKE T, ANDERSEN P: Human T-cell responses to secreted antigens fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immun* 1995; 63:1491.
6. RAVN P, BOESEN H, PEDERSEN BK, ANDERSEN P: Human T cell responses induced by vaccination with *My-*

COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES IMUNES INDUZIDAS POR PROTEÍNAS FILTRADAS DA CULTURA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*/DIANE J. ORDWAY, H. SILVEIRA, L. COSTA, S. COSTA, M. MARTINS, R. BADURA, M.J. ARROZ, H.M. DOCKRELL, S. YOUNG, F.A.A.N. VENTURA.

- cobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. J Immunol 1997; 158:1949.
7. HARBOE M, OETTINGER T, WIKER HG, ROSENKRANDS I, ANDERSEN P: Evidence for occurrence of ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 1996; 64:16.
  8. RAVN P, DEMISSIE A, EGUALE T *et al*: Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1999; 179:637.
  9. SILVEIRA H, ORDWAY D, DOCKRELL H, JACKSON M, VENTURA F: Cell mediated immune responses to mycobacterial antigens in patients with pulmonary tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. Clin Exp Immunol 1997; 110:26.
  10. TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 75:4350.
  11. MORENO C, MEHLERT A, LAMB J: The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T-cell proliferation. Clin Exp Immunol 1988; 74:206.
  12. SONNENBERG MG, BELISLE JT: Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. Infect Immun 1997; 65:4515.
  13. ORME IM: The molecular targets of T-cells in acquired immunity to tuberculosis. Immunol Letters 1991; 30:207.
  14. TOOSSI Z, KLEINHENZ ME, ELMER JJ: Defective interleukin-2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. J Exp Med 1986; 163:1162.
  15. JOHNSON BJ, McMURRAY DN: Cytokine gene expression by culture of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. Infect Immun 1994; 62:1444-1450.
  16. KLEINHENZ ME, ELMER JJ: Antigen responsiveness during tuberculosis: regulatory interaction of T-cell subpopulations and adherent cells. J Lab Clin Med 1987; 110:31.
  17. BARNES PF, MODLIN RL: Human cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Currents Topics in Microbiology and Immunology 1996; 215:297-319.
  18. ZHANG M, GONG J, PRESKY DH, XUE W, BARNES P: Expression of IL-12 receptor B1 and B2 subunits in human tuberculosis. J Immunol 1999; 162:2441-2447.