



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**PAPEL DE MEDIADORES SOLÚVEIS NA RESPOSTA IMUNE
EM MODELOS DE PROTEÇÃO CONTRA
*O Mycobacterium tuberculosis***

THEOLIS COSTA BARBOSA

**Salvador - Bahia - Brasil
2002**



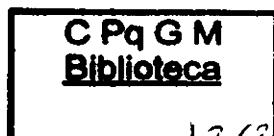
Pós-Graduação em Patologia

PAPEL DE MEDIADORES SOLÚVEIS NA RESPOSTA IMUNE EM MODELOS DE PROTEÇÃO CONTRA O *Mycobacterium tuberculosis*

Theolis Costa Barbosa

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Patologia, pelo Curso de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Faculdade de Medicina / UFBA, sob a orientação do Prof. Dr. MANOEL BARRAL-NETTO (FAMED/UFBA).

Salvador – Bahia, 2002



RESUMO

PAPEL DE MEDIADORES SOLÚVEIS NA RESPOSTA IMUNE EM MODELOS DE PROTEÇÃO CONTRA O *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. THEOLIS COSTA BARBOSA.

[INTRODUÇÃO] A imunoprofilaxia permanece como uma importante ferramenta para o controle da pandemia tuberculosa. Neste contexto, assume especial importância o estudo de marcadores que possam ser correlacionados à proteção contra a doença, tornando mais viável em termos de custo-benefício a avaliação de novas vacinas e imunoterápicos. A detecção de mediadores solúveis implicados na resposta contra a micobactéria pode revelar potenciais marcadores de proteção, além de constituir um método suficientemente simples para aplicação em grandes grupos populacionais.

[ESTRATÉGIA] Nós escolhemos avaliar a modulação de mediadores solúveis em duas situações-modelo identificadas com o desenvolvimento de uma resposta eficaz contra o bacilo na infecção humana: a tuberculose pleural, por ser uma forma que apresenta regressão espontânea dos sintomas, e a vacinação com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que pode ser relacionada a altos índices de proteção pelo menos contra as formas mais graves da doença. Partindo dos pressupostos de que (1) os mecanismos de contenção do bacilo estimulados nestas duas situações estarão também implicados na resposta à infecção primária, e (2) mediadores que apresentem uma variação significativa em ambos os estudos poderão ser úteis para estimar a eficácia de novas estratégias vacinais, nós avaliamos a evolução do perfil de mediadores solúveis nestes dois modelos de proteção contra o *M. tuberculosis*.

[RESULTADOS] Nos dois estudos foi possível identificar correlações entre os níveis de citocinas do tipo Th1. A associação desta resposta à ativação linfocitária no sítio de infecção em pacientes com tuberculose pleural, e a potencialização da produção *in vitro* de IFN- γ após a re-vacinação com BCG em crianças em idade escolar, reforçam a participação de uma resposta imune considerada protetora contra o bacilo em ambas as situações-modelo estudadas. Em pacientes com tuberculose pleural, níveis diminuídos de IFN- γ e TNF- α foram associados à regressão espontânea dos sintomas e à resolução da reação granulomatosa, sugerindo um papel da modulação negativa da resposta anti-micobacteriana na proteção contra a doença. Também foi evidenciada nos dois estudos a correlação entre os níveis de TNF- α e IL-10, sugerindo um papel para a IL-10 na modulação da resposta imune celular e provavelmente na limitação do dano tecidual associado a esta resposta.

[CONCLUSÕES] Nosso trabalho reforça a aplicabilidade da investigação de mediadores solúveis para a estimativa da eficácia de novas estratégias vacinais, apontando como candidatos de interesse as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, mediadores implicados em nossos estudos na proteção contra a infecção pelo *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

ROLE OF SOLUBLE MEDIATORS OF THE IMMUNE RESPONSE IN MODELS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* INFECTION CONTROL. THEOLIS COSTA BARBOSA.

[INTRODUCTION] Immunoprophylaxis remains an important tool for tuberculosis control. Special attention has been given to the study of markers potentially correlated to protection against the disease, which may be used as endpoints in vaccine trials contributing to lower the cost of evaluation of new vaccines or immunotherapeutic strategies. Soluble mediators implicated in the immune response against mycobacteria may be assessed as surrogate markers of protection, using methods simple enough to allow their application to the study of large populations. [STRATEGY] We decided to evaluate the modulation of soluble mediators in two model situations associated with the development of a protective response against the bacillus in human infection: pleural tuberculosis, because patients with this form of the disease may present spontaneous regression of the symptoms; and Bacillus of Calmette-Guérin (BCG) vaccination, which has been demonstrated to protect against the most severe forms of the disease. Based on the assumptions that (1) mechanisms of infection control stimulated in these two situations will also participate in the immune response to primary infection, and (2) mediators that present measurable variation in both studies may be useful to estimate the efficacy of new vaccine strategies, we have evaluated the evolution of the profile of soluble mediators in these two models of protection against *M. tuberculosis*. [RESULTS] In both studies we were able to identify correlations between the levels of Th1 cytokines. The association of this response to lymphocyte activation at the site of infection in tuberculous pleurisy patients, and the magnification of IFN- γ *in vitro* response of school-age children after BCG re-vaccination, support the participation of a putative protective immunity against mycobacteria in both model situations studied. In tuberculous pleurisy patients, diminished levels of both IFN- γ and TNF- α were found to be associated with spontaneous regression of symptoms and resolution of granulomatous lesions, suggesting a role for the down-modulation of anti-mycobacterial response in the protection against the disease. TNF- α and IL-10 levels were correlated in both studies, suggesting that IL-10 may play a role in the modulation of the cellular immune response, thereby limiting the extent of tissue damage associated to it. [CONCLUSIONS] Our work supports the applicability of the investigation of soluble mediators to estimate the efficacy of new vaccine strategies, and suggests the cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-10, mediators here implicated in the protective response against *M. tuberculosis*, as putative surrogate markers of protection.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida
ATS	American Toraxic Society
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CEME	Central de Medicamentos
DOTS	<i>Directly Observed Therapy Short-course</i> (Terapia Supervisionada de Curta duração)
E	Etambutol
Et	Etionamida
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
H	Isoniazida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12

IL-13	Interleucina-13
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
IUATLD	International Union Against Tuberculosis and other Lung Diseases
MCP-1	Proteína Quimioatrativa para Monócitos-1
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNCT	Plano Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	Derivado Proteico Purificado
R	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
S	Estreptomicina
sIL-2R	Receptor solúvel de Interleucina-2
SPF	<i>Specific Pathogen-Free</i> (Ausência de Patógenos Específicos)
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral-beta
Th0	Resposta auxiliar de linfócito T do tipo 0 (mixta)
Th1	Resposta auxiliar de linfócito T do tipo 1 (celular)
Th2	Resposta auxiliar de linfócito T do tipo 2 (humoral)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TU	Unidade Tuberculínica
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	12
1.1 MEDIDAS DE CONTROLE DA TUBERCULOSE	12
1.2 PROBLEMAS ENFRENTADOS NO CONTROLE DA TUBERCULOSE	24
1.3 PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DA EPIDEMIA TUBERCULOSA	32
1.4 PAPEL DE MEDIADORES SOLÚVEIS NA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	40
2 INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE MEDIADORES SOLÚVEIS EM MODELOS HUMANOS DE RESPOSTA PROTETORA CONTRA O <i>M. TUBERCULOSIS</i>	12
2.1 OBJETIVOS DOS ESTUDOS REALIZADOS	53
2.2 MANUSCRITO I:	55
2.3 MANUSCRITO II:	79
3 DISCUSSÃO	108
4 CONCLUSÕES	118
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
6 ANEXOS	138

1 APRESENTAÇÃO

A tuberculose é hoje a doença infecciosa responsável pelo maior número de mortes entre jovens e adultos em todo o mundo [www.who.int/gtb/publications/factsheet/index.htm]. Historicamente, a tuberculose atingiu índices máximos de morbidade e mortalidade nos séculos dezessete e dezoito, durante os quais estima-se que praticamente a totalidade da população da Europa Ocidental estava infectada com o seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis* (DANIEL *et al*, 1994). A doença entrou em regressão com a sobrevivência dos hospedeiros mais resistentes, a melhoria das condições de vida, os primeiros resultados das medidas de saúde pública e o desenvolvimento de vacinas, e após o desenvolvimento de antibióticos no início da década de 50 (DANIEL *et al*, 1994; ROSEMBERG, 1999; RUFFINO-NETTO, 1999a). Em poucas décadas, no entanto, a tuberculose voltou a se destacar como problema de saúde mundial, principalmente com o advento da AIDS, o surgimento de cepas resistentes a múltiplas drogas, e o aprofundamento das desigualdades sociais. Atualmente, cerca de 80% dos casos novos da doença estão concentrados em 22 países, entre os quais o Brasil figura em décimo quarto lugar (WHO, 2001).

1.1 Medidas de controle da tuberculose

A aparência frágil e pálida típica dos doentes de tuberculose era associada ao intelecto e à sensibilidade na visão romântica do início do século XIX. Após a descoberta da natureza infecciosa da doença, a tuberculose passou a inspirar receio, e as medidas de prevenção começaram pelo isolamento dos doentes (DANIEL *et al*, 1994).

Em alguns países a doença foi relacionada a uma vida desregrada, à ignorância e ao desleixo, e mesmo a um caráter perverso (BRYDER, 1999). O tratamento então consistia na imposição de disciplina severa, boa alimentação e exercícios, quer sob isolamento em sanatórios, quer em locais afastados, onde o doente pudesse se beneficiar do ar puro e de um clima ameno (BRYDER, 1999; ROSEMBERG, 1999). A impotência médica face à tuberculose na época refletia-se na fachada do famoso Andirondake Cottage Sanatorium, fundado por Edward Livingston Trudeau, onde se lê o aforismo de Hipócrates: "curar às vezes, aliviar quando possível, consolar sempre" (ROSEMBERG, 1999).

Já no início do século XIX era de conhecimento corrente que os doentes apresentavam sensibilidade diferenciada à tuberculose, e que mesmo pacientes com doença grave podiam apresentar cura espontânea dos sintomas. No final do século XIX, a partir de experiências com a inoculação de bacilos da tuberculose vivos ou mortos pelo calor em cobaias, Robert Koch demonstrou a existência de imunidade adquirida após a infecção tuberculosa primária, capaz de evitar a disseminação da bactéria em animais inoculados duas vezes por via cutânea. Koch tentou utilizar este extrato, por ele denominado tuberculina, na imunoterapia de pacientes com tuberculose, sem sucesso, mais tarde a reação à tuberculina seria utilizada como auxiliar no diagnóstico da infecção tuberculosa (DANIEL *et al*, 1994). Apesar disso, a comunidade científica experimentava uma fase de grande otimismo e expectativa, com os avanços da bacteriologia e o sucesso da terapia contra a difteria desenvolvida por Emil von Behring, baseada no uso do soro contra a toxina diftérica (BRYDER, 1999), e de Louis Pasteur, com o desenvolvimento da vacina de vírus atenuado contra a raiva (DANIEL *et al*, 1994). Vários grupos empenhavam-se portanto no desenvolvimento de uma vacina contra a tuberculose, destacando-se os chefiados por Edward Trudeau nos Estados

Unidos, Friedrich Friedmann na Alemanha, Henri Spahlinger na Suíça e Leon Calmette e Camille Guérin na França (BRYDER, 1999)

1.1.1 VACINAÇÃO COM O BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)

A história da vacinação BCG foi marcada pelo momento sócio-econômico e político da Segunda Guerra Mundial e do Pós-Guerra na Europa. Na Alemanha, em 1937, o trabalho de Friedmann, pesquisador de origem judaica, utilizando a espécie *M. chelonae*, de baixa patogenicidade natural em hospedeiros mamíferos, foi embargado como resultado da crescente onda de nacionalismo e anti-semitismo. A influência política da França junto à UNICEF contribuiu para o reconhecimento da eficácia e inocuidade da vacinação com BCG pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que passou a estimular a sua ampla difusão (MAES, 1999).

Nem todos os países implementaram a vacinação com BCG como parte de suas políticas públicas de saúde. Introduzida na Alemanha em 1925, a vacina foi descontinuada em 1931 após a morte de 72 crianças vacinadas em Lübeck, apesar do reconhecimento por inquérito judicial da contaminação acidental do lote de vacina administrado como causa deste desastre. Considera-se que esta rejeição pode também ter tido um cunho político, de acordo com a tendência nacionalista da Alemanha com a ascensão do Nazismo.

Na Inglaterra, a vacinação com BCG não era considerada suficientemente segura pelo Conselho de Pesquisa Médica Britânico, e as autoridades de saúde pública não estavam convencidas da eficácia do BCG dadas as falhas estatísticas e a falta de controles apropriados apontados pelos especialistas britânicos nos estudos conduzidos

na Escandinávia e na França. No entanto, no Pós-Guerra, crescia o número de casos diagnosticados pela introdução de campanhas de radiografia em massa, bem como o medo após a divulgação de pesquisas que apontavam maior risco de infecção em enfermeiras trabalhando nos sanatórios. Em 1947, o Ministério da Saúde Britânico recomendou a realização de estudos para avaliação da eficácia da vacinação com BCG, mas já no início da década de 50 a vacinação com BCG foi adotada para enfermeiras britânicas e crianças em idade escolar na Escócia, antes mesmo da obtenção dos primeiros resultados destes estudos (BRYDER, 1999).

Nos Estados Unidos predominava uma visão semelhante à dos especialistas britânicos quanto à ineficácia e a falta de segurança da vacinação com BCG. Neste país vários estudos foram conduzidos para a avaliação da vacina, chegando a resultados divergentes. Os Estados Unidos mantiveram portanto sua posição de rejeitar a implementação da vacina, advogada de maneira especialmente contundente depois que a Inglaterra endossou o BCG, deixando os Estados Unidos isolado em sua oposição (BRYDER, 1999). No início da década de 50, no entanto, os excelentes resultados da quimioterapia anti-tuberculosa, inicialmente utilizando a estreptomicina, em 1944, e posteriormente com o uso da isoniazida, em 1952 (DANIEL *et al.*, 1994), geraram um grande otimismo por parte das autoridades de saúde pública, que passaram então a enfatizar a detecção precoce dos casos, através do teste tuberculínico, e a utilização da quimioterapia (BRYDER, 1999).

Após a década de 1950 foram conduzidos os principais estudos em grande escala para avaliar a proteção conferida pela vacinação BCG (BLOOM & FINE, 1994). Destacam-se o realizado em Chingleput, na Índia, com a participação de mais de setenta mil indivíduos (Tuberculosis Prevention Trial, 1979; Tuberculosis Research Centre, 1999), e o do Norte do Malawi, na África, onde foi levada em consideração a

manutenção da cadeia fria na eficácia da vacina (Karonga Prevention Trial Group, 1996), ambos indicando proteção nula conferida pelo BCG contra a tuberculose pulmonar. Outros estudos demonstraram elevada eficácia da vacinação BCG (FINE & RODRIGUES, 1990; COLDITZ *et al*, 1994; COMSTOCK, 1994). Fatores apontados para justificar as discrepâncias entre os estudos incluem o uso de diferentes cepas vacinais, más condições de estocagem da vacina, diferenças genéticas entre as populações estudadas, vieses de coleta dos dados, e a exposição diferenciada geograficamente a micobactérias ambientais. Esta poderia conferir proteção "natural" contra a doença, a qual não estaria sendo amplificada pela administração do BCG (COLDITZ *et al*, 1994; FINE, 1995). Estes resultados, no contexto das divergências já existentes entre os especialistas quanto à utilidade da vacina, contribuíram ainda mais para as diferenças entre os países quanto à administração do BCG e esquemas vacinais a serem implementados em suas políticas públicas (FINE & RODRIGUES, 1990). Mesmo alguns países onde os estudos nacionais apontaram eficácia significativa da vacinação BCG contra a tuberculose decidiram por sua descontinuação, devido à queda do número de casos da doença em seu território, em contraste com a frequência esperada de linfadenites e outras complicações decorrentes da administração da vacina (FINE & RODRIGUES, 1990; ROMANUS *et al*, 1992; COHN, 1997). Atualmente, os Estados Unidos e alguns países Europeus recomendam a vacinação BCG apenas em grupos de alto-risco (Karonga Prevention Trial Group, 1996; TRNKA *et al*, 1998).

No Brasil, a vacinação é obrigatória para os menores de um ano desde 1976, sendo administrada preferencialmente logo após o nascimento (SOARES *et al*, 1994). A cepa utilizada é a Moreau - Rio de Janeiro, mantida sob o sistema de lote semente no Statens Serum Institut de Copenhagen, encaminhada e distribuída periodicamente através dos laboratórios da Fundação Atilafho de Paiva e do Instituto Butantan

(FUNASA, 1998b). Os estudos nacionais que procuraram avaliar a eficácia da vacina são poucos, e apontam um papel protetor contra a meningite tuberculosa em crianças até cinco anos de idade (CAMARGOS *et al*, 1988; WUNSCH FILHO *et al*, 1990). A frequência de reações adversas em um estudo realizado em 1983 foi de 0,04% (FUNASA, 1998b). Está em curso um estudo para avaliação da eficácia da segunda dose de BCG em escolares frequentando a rede pública de ensino, nas cidades de Salvador e Manaus (www.liv.ac.uk/1stm/ihtm2-con.html; BIERRENBACH *et al*, 2001). No contexto desta avaliação, Dourado e colaboradores observaram 1 caso de reação adversa à vacina BCG a cada 2.854 doses administradas, sendo maior o risco entre crianças que apresentavam cicatriz sugestiva de vacinação prévia (Susan M. Pereira, comunicação pessoal). A recomendação da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) atualmente é de que crianças em idade escolar e trabalhadores da área de saúde expostos ao risco de contrair tuberculose sejam revacinados, e que recém-nascidos e crianças soro-positivas para o HIV ou filhos de mãe soropositiva sejam vacinados desde que não apresentem sintomas de imuno-deficiência (febre prolongada, diarreia crônica, perda de peso importante, sudorese noturna, astenia e adenomegalia) (PENNA *et al*, 2000).

1.1.2 DETECÇÃO PRECOCE DOS CASOS ATRAVÉS DO TESTE TUBERCULÍNICO

A possibilidade de se detectar precocemente a infecção tuberculosa na ausência de sintomas foi preconizada inicialmente por Koch, a partir de seus trabalhos demonstrando a indução de uma reação de hipersensibilidade tardia por inoculação cutânea da tuberculina em cobaias infectadas experimentalmente e em pacientes tuberculosos (DANIEL *et al*, 1994). O teste tuberculínico cutâneo foi substituído

posteriormente pela inoculação intradérmica, introduzida simultaneamente por Mendel e Mantoux, que permitia a administração de uma quantidade exata de extrato com o auxílio de uma seringa. Florence Seibert estabeleceu o método de purificação e avaliação da tuberculina, de forma a padronizar a composição e a atividade biológica do preparado para a realização dos testes cutâneos. O Derivado Proteico Purificado produzido foi recomendado como padrão internacional em 1951 pela OMS (PPD-S, "standard"). Uma porção deste lote de referência (Lote 49608) é mantido no Statens Serum Institut (Copenhague, Dinamarca), sendo distribuído para a realização de ensaios de atividade biológica para calibração de lotes de PPD produzidos com fins comerciais. A unidade internacional de tuberculina é definida como a atividade biológica contida em 0.000028 mg da preparação padrão 49608 em cobaias (RIEDER, 1999).

Em 1955 o Statens Serum Institut, a pedido da OMS, desenvolveu um lote para uso internacional onde foi incluído o detergente Tween-80 como agente estabilizador, resultando o PPD RT 23, de maior potência em seres humanos do que o PPD-S. A dose para utilização destas preparações de PPD foi estabelecida em estudos comparativos da resposta ao teste cutâneo em indivíduos expostos e pacientes versus indivíduos não-expostos, chegando-se às doses-padrão de 0.1 mg de PPD-S 5 TU (Unidades Tuberculínicas) e 0.1 mg de PPD RT 23 2 TU para discriminação ótima entre indivíduos infectados e controles (RIEDER, 1999).

O teste tuberculínico tem custo elevado, não apenas relacionado à aquisição do reagente, mas também devido ao seu armazenamento obrigatoriamente ao abrigo da luz e do calor, e à sua validade curta. A administração correta e a leitura requerem treinamento e habilidade técnica para a padronização do resultado do procedimento (ENARSON *et al*, 2000).

A positividade ao teste tuberculínico pode estar presente em indivíduos não expostos à infecção tuberculosa. Indivíduos vacinados com BCG tornam-se responsivos ao PPD, sendo as taxas de conversão dependentes da população considerada, da dose de vacina, da cepa vacinal e da via de administração utilizadas (de ALMEIDA *et al*, 1973; de PADUA DIAS & HAYASHI, 1978; MENZIES, 2000; COKER & van WEEZENBEEK, 2001). Porém, a intensidade da reação induzida pela vacinação BCG não é estável, diminuindo e até desaparecendo com o tempo após a vacinação, principalmente em indivíduos vacinados no período neonatal (BAILY *et al*, 1980; MENZIES, 2000). Algumas infecções parecem afetar a responsividade ao PPD, como no caso do sarampo, que diminui a reatividade ao teste tuberculínico (RIEDER, 1999). Por outro lado, a exposição a micobactérias ambientais, não patogênicas ou de baixa patogenicidade, pode induzir responsividade ao teste tuberculínico (RIEDER, 1999). A intensidade da resposta a sensitinas de micobactérias não tuberculosas foi relacionada à proximidade filogenética das espécies prevalentes ao *M. bovis* atenuado vacinal em uma população vacinada com BCG (BIERRENBACH *et al*, 2001). Esta observação é interessante no contexto da associação entre eficácia vacinal e regiões geográficas, uma vez que o gênero *Mycobacterium* apresenta 92 espécies reconhecidas (EUZEBY, 2001), com ampla distribuição geográfica, diversidade de habitats (água, solo, pele, hospedeiros vertebrados) e variadas relações com outros organismos (GANGARDHARAM & JENKINS, 1997), incluindo mais de 20 espécies com variados graus de patogenicidade para o homem (CDC, 1985; SATO, 1999).

Alguns pacientes são persistentemente anérgicos ao teste tuberculínico. Estes casos frequentemente estão associados a um mau prognóstico (BOUSSIOTIS *et al*, 2000). Por outro lado, nem todos os indivíduos vacinados com BCG, em situação de risco elevado de infecção, ou em contato com antígenos do bacilo apresentam

positividade ao PPD, o que pode indicar quer uma anergia por fatores inerentes ao indivíduo testado, quer uma dissociação entre infecção com o *M. tuberculosis*, resposta protetora contra o bacilo ou responsividade a antígenos micobacterianos e intradermorreação à tuberculina.

Finalmente, alguns autores sugerem que a positividade ao teste tuberculínico em indivíduos assintomáticos pode refletir não uma infecção latente, mas uma resposta persistente de memória adquirida após a resolução da infecção primária com a eliminação completa do bacilo (ORME, 2001a).

No Brasil, o teste tuberculínico é considerado auxiliar no diagnóstico da infecção tuberculosa em indivíduos não vacinados, já que a vacinação com BCG induz a reatividade à tuberculina, e considerando-se o elevado custo do teste tuberculínico. O diagnóstico no país enfatiza a história clínico-epidemiológica, a baciloscopia direta do escarro e outras secreções corporais, a cultura do bacilo a partir destes espécimens para os pacientes com suspeita clínica persistentemente negativos à baciloscopia, e os achados radiográficos (PENNA *et al*, 2000).

1.1.3 TRATAMENTO DOS PACIENTES E QUIMIOPROFILAXIA PARA REATORES À TUBERCULINA E COMUNICANTES

O tratamento dos pacientes tuberculosos tem efeito importante no controle da doença enquanto medida de saúde pública. O risco da transmissão do bacilo a comunicantes do caso índice está relacionado à proximidade das relações pessoais e à positividade do escarro (RIEDER, 1999). O tratamento possibilita a negatificação do escarro em poucas semanas, desta forma diminuindo a transmissão do bacilo (RIEDER, 1999). Alguns países industrializados baseiam portanto suas políticas de controle da

tuberculose apenas na detecção precoce e tratamento dos pacientes tuberculosos (EFFEREN, 1999), realizando a busca ativa de casos novos através do teste tuberculínico em imigrantes e populações de risco, excluindo a vacinação com BCG para evitar reação inespecífica ao PPD, adotando amplamente a quimioprofilaxia de indivíduos PPD positivos e comunicantes de pacientes com tuberculose e realizando uma estreita vigilância epidemiológica (COKER & van WEEZENBEEK, 2001).

Também a estratégia de prevenção recomendada pela Organização Mundial de Saúde desde 1994 enfatiza (1) a detecção de casos novos, ressaltando o engajamento das autoridades públicas no combate à tuberculose; (2) a garantia do tratamento regular pelo sistema de saúde, com atenção à provisão de medicamentos anti-tuberculosos; (3) a administração supervisionada das drogas pelo menos no início do tratamento, principalmente para os pacientes em uso de rifampicina; e (4) a implementação e manutenção de um sistema de registro e notificação de casos da doença para controle epidemiológico (AIT-KHALED & ENARSON, 1999; BLEED *et al*, 2000).

Estima-se que em populações micobacterianas contendo entre 10^6 e 10^8 bactérias (típicas em doentes com tuberculose pulmonar com cavitação), sejam sempre encontrados bacilos naturalmente resistentes a uma droga anti-tuberculosa. A monoterapia nestes casos seleciona os mutantes resistentes originando uma cepa resistente à droga (resistência secundária). Bacilos multi-resistentes podem se originar a partir de eventos de seleção posteriores, segundo o mesmo princípio. Pacientes sem histórico prévio de tratamento anti-tuberculose podem apresentar o fenômeno de resistência/multi-resistência, se foram infectados com uma cepa resistente (resistência primária) (AIT-KHALED & ENARSON, 1999).

A resistência está associada a mutações pontuais, deleções e inserções em genes que codificam quer o alvo da droga, quer as enzimas envolvidas na sua ativação. A resistência a cada droga pode ser vinculada a um evento genético particular; portanto, o fenótipo de multi-resistência está associado à aquisição sequencial de mutações em diferentes loci. Em algumas situações pode ocorrer resistência cruzada a drogas quimicamente semelhantes, como por exemplo à rifampicina e seus derivados, ou com o mesmo alvo na célula bacteriana, como no caso de algumas mutações que conferem resistência simultânea à isoniazida e à etionamida (SOMOSKOVI *et al*, 2001). Para evitar o aparecimento de resistência, a terapia atual consiste em combinações entre os antibióticos rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z), etambutol (E), estreptomicina (S) e etionamida (Et), administrados no período de seis meses a um ano a depender da forma de tuberculose, da positividade ao HIV e da história da doença (primeiro tratamento, recidiva/abandono ou falha terapêutica prévia) (PENNA *et al*. 2000). Outras drogas podem ser adicionadas de forma complementar, especialmente em doentes crônicos com história de falha terapêutica (AIT-KHALED & ENARSON, 1999). Indivíduos positivos ao teste tuberculínico em países industrializados como os Estados Unidos são tratados em regime profilático por dois meses com isoniazida (COKER & van WEEZENBEEK, 2001).

Os efeitos colaterais das drogas anti-tuberculosas são graves, e incluem reações desagradáveis para o paciente que podem induzir uma sensação de falta de melhora e frequentemente levam ao abandono do tratamento. Entre estas reações desagradáveis estão tremores, distúrbios mentais e incoordenação motora (isoniazida), prurido, anorexia, náuseas, vômitos, mal-estar abdominal e diarreia (rifampicina). O tratamento com rifampicina pode também induzir febre, calafrios, cefaléia, tonturas, e dores musculoesqueléticas após três meses de tratamento, especialmente em pacientes que

tomam a droga irregularmente. Pacientes tratados com isoniazida, rifampicina ou pirazinamida podem desenvolver hepatite, por vezes fatal. A associação destas drogas tem efeito aditivo sobre sua hepatotoxicidade (LIBBS Farmacêutica LTDA, 2000). O risco de hepatite associada à isoniazida também aumenta com a idade (MURRAY, 1994) e a ingestão de álcool (LIBBS Farmacêutica LTDA, 2000)

O uso da terapia supervisionada de curta duração ("Directly Observed Therapy Short-course", DOTS) permite encurtar o tempo de tratamento com a associação de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por 2 meses e manutenção de rifampicina e isoniazida por mais 4 meses (FARMER, 2001). O supervisionamento da administração diminui as taxas de abandono e o menor tempo de tratamento permite a diminuição do custo, em comparação com o "Esquema I" usado internacionalmente (1-2 meses de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol seguidos por 3-8 meses de tioacetona associada a pirazinamida) (ENARSON *et al*, 2000). A estratégia DOTS deve ser aplicada apenas em pacientes que nunca receberam tratamento prévio contra a tuberculose, com vigilância estrita da susceptibilidade às drogas utilizadas no tratamento (FARMER, 2001). A implementação desta terapia vem sendo acompanhada pela OMS especialmente nos países em desenvolvimento e sub-desenvolvidos que apresentam os maiores índices de prevalência da doença (RUFFINO-NETTO, 1999a).

No Brasil, o Esquema I, indicado para casos novos de todas as formas de tuberculose exceto a meningite, consiste na administração de rifampicina, isoniazida e pirazinamida por 2 meses, mantendo a associação rifampicina e isoniazida por mais 4 meses. Recidivantes e pacientes que abandonaram o tratamento recebem o mesmo esquema reforçado com a administração de etambutol, tanto na fase inicial como na fase posterior de manutenção (PENNA *et al*, 2000). Apesar de atuar apenas como bacteriostático o etambutol tem efeito na prevenção do aparecimento de resistência

(AIT-KHALED & ENARSON, 1999). A Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), através da Central de Medicamentos (CEME), fornece gratuitamente todo o tratamento. A previsão da quantidade necessária de drogas é feita pelo Ministério da Saúde e o controle da qualidade é de responsabilidade do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (NATAL *et al*, 1999b). Em 1998, foi iniciada a implantação do atual Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), que prevê, entre outros, a realização de baciloscopia em todos os sintomáticos respiratórios e comunicantes, assegurar o provisionamento das drogas, implementar gradualmente o tratamento supervisionado, vigiar o aparecimento de resistência às drogas anti-tuberculosas e manter um sistema de informação adequado incluindo todas as doenças de comunicação compulsória, seguindo as diretrizes da OMS (RUFFINO-NETTO, 1999 a,b).

1.2 Problemas enfrentados no controle da tuberculose

1.2.1 DESIGUALDADES SOCIAIS E POLÍTICAS PÚBLICAS

A associação entre pobreza e (falta de) saúde em relação a doenças infecciosas é bem conhecida (WEISS & ADDINGTON, 1998). No caso da tuberculose, sabe-se que o risco de infecção tuberculosa aumenta com a densidade populacional. Portanto, as condições precárias de moradia frequentemente associadas à pobreza, às instituições carcerárias, a populações refugiadas ou deslocadas aumentam a transmissibilidade do bacilo (AIT-KHALED & ENARSON, 1999). A desnutrição também tem influência na evolução da infecção tuberculosa. Em um estudo retrospectivo, Shirai e colaboradores (SHIRAI *et al*, 1990) observaram pior estado nutricional (com base na determinação de

proteína sérica total, albumina, colesterol sérico total e hemoglobina) em pacientes com tuberculose pulmonar ativa que evoluíram para óbito do que em pacientes liberados do hospital com melhora clínica após a quimioterapia. Alguns estudos têm sido realizados no modelo murino procurando evidenciar aspectos da resposta imune celular contra a infecção micobacteriana que são afetados pela deficiência de nutrientes específicos (DAI *et al.* 1998). Neste aspecto, Chan e colaboradores (CHAN *et al.*, 1996) demonstraram que camundongos infectados com *M. tuberculosis* sob dieta hipoproteica apresentam granulomas desorganizados com necrose caseosa central, o que está associado à diminuição da produção inicial de citocinas e da detecção de óxido nítrico a nível sistêmico em comparação com camundongos infectados sob uma dieta balanceada de nutrientes.

Alguns autores sugerem que a incidência de infecção tuberculosa reflete de certo modo a qualidade da infra-estrutura pública de saúde (HORWITCH, 2000) e o investimento dos governos no bem-estar social (Lee W. Riley, 1º Curso Nacional de Epidemiologia Molecular em Doenças Infecciosas Emergentes da FIOCRUZ-BA). Neste contexto, Rieder menciona que o único fator que coincide com o início do declínio da prevalência da tuberculose após 1992 nos Estados Unidos foi o estabelecimento de um financiamento adequado para o controle da tuberculose (RIEDER, 1999). Por outro lado, a deterioração das condições sócio-econômicas nas cidades do interior do mesmo país mostra uma associação com o aumento da mortalidade infantil e da incidência de doenças sujeitas à notificação, incluindo a tuberculose (WEISS & ADDINGTON, 1998). No México, o Estado de Chiapas, um dos estados com maior grau de pobreza e limitação de recursos de saúde, a taxa anual de incidência de tuberculose pulmonar é quase o dobro da observada a nível nacional (SANCHEZ-PEREZ *et al.*, 2001). Alguns autores criticam portanto a ênfase dada ao

suprimento das drogas em programas de ajuda internacionais para os países mais pobres, sem um desenvolvimento em paralelo da infra-estrutura de assistência e de programas de combate à pobreza (KVALE, 2001).

1.2.2 TOLERÂNCIA AO TRATAMENTO. ABANDONO E MULTI-RESISTÊNCIA

Os efeitos colaterais das drogas e a longa duração do tratamento em comparação com o período de melhora dos sintomas são fatores que dificultam a adesão ao tratamento anti-tuberculose e/ou seu seguimento correto até o final do período recomendado. O abandono do tratamento após iniciada a administração das drogas pode colaborar para o aparecimento de multi-resistência, pois os bacilos com menor susceptibilidade inicial (em portadores de resistência primária a uma ou mais drogas utilizadas) podem ser eliminados mais tardiamente do que os bacilos completamente susceptíveis. Por outro lado, o uso da estratégia DOTS em pacientes infectados com cepas resistentes a isoniazida e/ou rifampicina, como resultado por exemplo da falta de realização de testes de susceptibilidade a drogas e/ou da aplicação irrefletida de políticas de saúde segundo procedimentos inflexíveis, pode resultar em um efeito amplificador da terapia de curta duração no desenvolvimento de multi-resistência/pan-resistência às drogas anti-tuberculosas. Isto porque neste esquema terapêutico a administração de rifampicina e isoniazida somada a pirazinamida e etambutol é mantida por apenas dois meses, a seguir aos quais a associação RH permanece como único tratamento por mais quatro meses, o que pode levar ao aparecimento de cepas resistentes às quatro drogas anti-tuberculosas de primeira linha após uma única falha terapêutica (FARMER, 2001).

Elevadas taxas de abandono do tratamento comprometem o controle da doença ao manter o bacilo na comunidade, e contribuem para a disseminação dos bacilos resistentes (NATAL *et al.*, 1999b). Alguns países prevêm a possibilidade de detenção para forçar a aderência ao tratamento, já praticada por exemplo nos Estados Unidos na metade do século XX e recentemente na década de 90 (na cidade de Nova Iorque, dado o pico observado do número de casos de infecção e resistência a antibióticos), bem como desde 1984 na Inglaterra (COKER, 2001). As questões éticas ao se determinar se há precedência dos direitos individuais dos pacientes face ao potencial risco para a saúde pública são particularmente difíceis de serem abordadas, considerando-se (1) as lacunas no conhecimento atual sobre o potencial infeccioso relacionado ao indivíduo isolado, bem como sobre a virulência das cepas e a susceptibilidade dos hospedeiros face à doença; (2) o fato de que as populações mais provavelmente afetadas são também as menos favorecidas socialmente; e (3) que as garantias de maior sucesso com a adoção de medidas coercivas são discutíveis (COKER, 2001; DOYAL, 2001).

1.2.3 MOVIMENTOS POPULACIONAIS

Estima-se que apenas 5% dos 7,5 a 8 milhões de casos novos anuais atualmente esperados de tuberculose ocorram nos países industrializados (RIEDER, 1999). As perspectivas atuais são de um contínuo declínio do número de casos de tuberculose nos países industrializados, e uma tendência ao crescimento ainda maior do número de casos nos países de baixa renda per capita atualmente com elevada incidência da doença, a exemplo dos países da África sub-Saariana (RIEDER, 1999). Entre estes extremos, vários países em desenvolvimento apresentam elevados índices da doença, e variadas estimativas de evolução entre ascendentes, estáveis ou decrescentes, conforme

as políticas de saúde adotadas vão se mostrando insuficientes ou em ajuste para o controle da tuberculose (BLEED *et al*, 2000).

Neste cenário torna-se importante nos países industrializados a proporção de casos entre imigrantes que desenvolvem a doença em seu território. Grande parte dos imigrantes nos países industrializados é proveniente de países com elevada incidência de tuberculose, e os casos da doença entre eles seriam resultantes da infecção em seus países de origem (RAVIGLIONE *et al*, 2001). Hayward e colaboradores (HAYWARD *et al*, 2000) mostram que aproximadamente metade dos casos de falha terapêutica documentados na Inglaterra e no País de Gales entre 1993 e 1994 ocorreram entre imigrantes que ou foram contaminados com uma cepa resistente a drogas em seu país de origem ou já tinham sido tratados de forma insuficiente contra infecção tuberculosa antes de entrarem na Inglaterra. O problema é agravado pelo fato de muitos imigrantes apresentarem-se em situação ilegal de entrada nestes países, sem acesso a assistência médica e sem o conhecimento das autoridades de saúde. Mesmo entre os imigrantes em situação regular a detecção de casos de tuberculose pode ser dificultada pelo caráter estigmatizante da obrigatoriedade do teste tuberculínico, e pelo uso da vacinação BCG em seus países de origem. Nestes indivíduos, a imposição da quimioprofilaxia representa dificuldades éticas ainda maiores, já que (1) os indivíduos não apresentam doença ativa e o risco de desenvolvimento de tuberculose em geral é relativamente baixo, caindo muito alguns anos após a ocorrência da infecção primária, (2) o tratamento praticado (administração de isoniazida por dois meses) apresenta efeitos colaterais importantes e não há estudos suficientes sobre a sua eficácia, e (3) parte importante dos casos detectados entre imigrantes foi infectada com cepas resistentes a isoniazida. Por outro lado, o uso de medidas coercivas torna os indivíduos-alvo propensos a tentarem se esquivar do *screening*, e a agressividade das drogas utilizadas,

combinada com a ausência de sintomas e o baixo nível médio de escolaridade neste grupo, facilita o abandono do tratamento e conseqüentemente contribui para o surgimento de cepas resistentes (COKER & van WEEZENBEEK, 2001).

1.2.4 PROBLEMAS NACIONAIS

No Brasil, a média do percentual de abandono do tratamento manteve-se em torno de 14% de 1977 a 1997 (RUFFINO-NETTO, 1999b). Em um estudo no Rio de Janeiro, entre os fatores de risco associados ao abandono do tratamento foram encontrados o baixo nível de escolaridade, a falta de estruturação familiar, a ausência de trabalho fixo/vínculo empregatício que permitisse direitos trabalhistas, entre eles assistência médica, a utilização diária e em grande quantidade de bebidas alcoólicas, o relato pelo paciente de desconhecimento da sua doença e de falta de melhora clínica, e a rejeição pelo paciente do serviço de saúde por insatisfação com o seu atendimento. Cerca de 80% dos casos de abandono ocorrem até o final do segundo mês de tratamento, quando os sinais e sintomas respiratórios desaparecem na maioria dos doentes (NATAL *et al.*, 1999a). No país, entre fatores de gravidade do quadro clínico e reações adversas às drogas utilizadas no tratamento, a hospitalização do doente também é indicada em "casos sociais", ou seja, ausência de residência fixa e grupos com "maior possibilidade de abandono do tratamento", especialmente para indivíduos em retratamento ou falha do Esquema I. Não raro, no entanto, o profissional de saúde é solicitado pelo doente ou seus familiares para a manutenção do internamento, dadas as condições de alimentação e assistência fornecidas no hospital (Dra. Tatiana Galvão, Hospital Octávio Mangabeira; comunicação pessoal).

Também contribuem para a ineficácia e abandono do tratamento da tuberculose no Brasil dificuldades inerentes aos serviços de saúde disponíveis para a população e problemas de gerenciamento da saúde pública. Em 1997 a OMS noticiou em sua *homepage* que o desmantelamento da Campanha Nacional Contra a Tuberculose durante o governo do Presidente Fernando Collor de Mello levou ao colapso da estrutura então responsável pelo atendimento e suprimento de medicamentos às comunidades no Brasil, e também enfatizou a tendência de aumento do número de casos no país, contrapondo que "entre todos os problemas da pobreza, é fácil para os administradores perder qualquer senso de urgência em se tratando de doenças antigas, de progressão lenta como a tuberculose" (www.who.int/gtb/publications/tbrep97/countries/brazil.htm). No mesmo ano o país chegou a experimentar a falta de medicamentos contra a tuberculose em praticamente todos os Estados, pelo não atendimento da programação feita pela Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária por parte do Ministério da Saúde (RUFFINO-NETTO, 1999b). Por outro lado, denúncias de cápsulas sem a droga ativa nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo puseram em questão a eficácia do controle de qualidade da medicação fornecida (NATAL *et al*, 1999b).

O tratamento em princípio deveria ser fornecido e acompanhado em Postos de Saúde próximos à residência do doente, mas é frequente que estes se mostrem incapazes de responder às necessidades da comunidade a que servem e conseqüentemente ocorre a concentração dos doentes nos Centros de Saúde e ambulatórios de nível terciário. Sobrecarregados, estes últimos não conseguem cumprir convenientemente as funções que lhes são atribuídas por seu nível de maior complexidade organizacional. O resultado é o atendimento deficitário e moroso à população. Os exames baciloscópicos e de cultura do escarro estão centralizados em poucos laboratórios, frequentemente distantes

dos Centros de Saúde, o que impõe limites à detecção e ao acompanhamento dos casos, bem como à avaliação de susceptibilidade ao tratamento. Dadas as dificuldades operacionais na realização da baciloscopia e cultura, indivíduos clinicamente estabilizados mas sem negatificação do escarro recebem alta e retornarão com recidiva ao sistema de saúde; em seu retorno não há avaliação da susceptibilidade bacteriana, resultando na redução do sucesso do tratamento e na disseminação de bacilos resistentes (NATAL *et al*, 1999b).

1.2.5 FATORES DO HOSPEDEIRO

O risco de evolução da infecção para a doença tuberculosa é potencializado pela desnutrição, pelo fumo, pelo uso de álcool e drogas ilícitas, pelo tratamento com drogas imuno-supressoras, pela co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) e por doenças concomitantes como a diabetes, linfomas malignos, insuficiência renal e silicose (AIT-KHALED & ENARSON, 1999; RIEDER, 1999). Os mecanismos através dos quais cada um destes fatores contribui para o desencadeamento e/ou evolução da doença tuberculosa em indivíduos infectados ainda não foram completamente elucidados, inclusive porque os conhecimentos atuais dos mecanismos envolvidos na sobrevivência do bacilo durante as fases assintomática e de doença ativa, bem como no controle imunológico da doença em cada uma destas fases, são limitados. Sabe-se que é possível recuperar bacilos com capacidade infecciosa a partir de lesões pulmonares que apresentam cultura e/ou reação álcool-ácido negativas (MANABE & BISHAI, 2000). Lesões primárias, onde ocorre a primeira "colonização" pelo bacilo, podem envolver mecanismos imunológicos de contenção da infecção com diferentes características e eficácia em comparação com as lesões secundárias, resultantes da

disseminação bacteriana para outros focos no pulmão. Por outro lado, o estado de "latência" propriamente dito do bacilo nestas lesões é discutível, como também o pressuposto de que focos de infecção primária em indivíduos PPD positivos necessariamente alberguem bacilos capazes de reativação (ORME, 2001a). Outro ponto controverso é a significância da reativação de focos "latentes" de infecção em termos epidemiológicos, dadas as evidências de um papel importante da reinfecção exógena no desenvolvimento de tuberculose em indivíduos previamente infectados ou mesmo em tratamento da doença tuberculosa (MANABE & BISHAI, 2000). A falta de conhecimento básico acerca destes mecanismos dificulta a abordagem de estratégias mais eficazes sobre o triângulo infecção-doença-transmissão do bacilo.

1.3 Perspectivas para o controle da epidemia tuberculosa

A Organização Mundial de Saúde tem acompanhado o desenvolvimento dos programas nacionais de controle da tuberculose nos países de elevada prevalência da doença (WHO, 2001). Tanto a OMS como outros organismos internacionais, a exemplo da União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças Pulmonares (IUATLD), têm disponibilizado dados epidemiológicos, avaliações e informações para o controle da doença e estabelecimento de uma rede eficaz de vigilância epidemiológica (www.who.int; www.paho.org; www.iatld.org).

No Brasil, o atual Plano Nacional de Controle da Tuberculose, lançado em outubro de 1998, estabeleceu como metas (1) o aumento da detecção dos casos de tuberculose, aproximando o número de notificações do número de casos esperados, (2) o aumento do percentual de sucesso do tratamento dos casos diagnosticados e (3) a

redução da incidência e da mortalidade da doença. De acordo com estas metas, o PNCT iniciou a implementação gradual do tratamento supervisionado, introduziu o pagamento de bônus aos municípios mediante a notificação de curas, e aumentou o preço pago pelo Ministério aos Serviços de Saúde para a realização de baciloscopias para o diagnóstico da tuberculose (RUFFINO-NETTO, 1999 a,b).

Também está sendo encorajado o treinamento dos profissionais de saúde em vigilância epidemiológica, e a informatização da notificação, em conjunto com outras doenças de informação obrigatória (FUNASA, 1998a; NATAL & ELIAS, 2000). Adicionalmente os dados epidemiológicos vêm sendo disponibilizados através da Internet pelo CENEPI (www.funasa.gov.br) e Secretarias Estaduais de Saúde (Bahia: www.saude.ba.gov.br), e está sendo montada uma Rede de Pesquisas em Tuberculose no Brasil, que se propõe a identificar os grupos de pesquisa atualmente envolvidos com tuberculose para acompanhamento e possivelmente apoio para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e de prevenção/combate à doença (RUFFINO-NETTO, 2002). O país, que já esteve no décimo lugar entre os países de maior prevalência da doença (RUFFINO-NETTO, 1999b), ocupava a décima terceira posição no relatório anual de Controle Global da Tuberculose realizado pela OMS em 2000 (BLEED *et al*, 2000), e desceu para o décimo quarto lugar no último relatório, referente a 2001 (WHO, 2001).

Merece destaque dentre as iniciativas de controle da doença o modelo empregado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas, que mesmo seguindo o esquema de terapia auto-administrada alcançou a extinção do abandono do tratamento com a implementação de medidas como a visita domiciliar aos pacientes faltosos e a realização de um atendimento diferenciado aos pacientes com maior risco de abandono de tratamento. Este inclui a promoção de uma maior percepção do processo saúde-

doença e o aumento da auto-valorização pelo paciente, através de assistência médica, psicológica e social por uma equipe multidisciplinar (PAIVA *et al*, 1999).

Estratégias novas para o combate da tuberculose deverão visar o controle da transmissão e do desenvolvimento da infecção para doença tuberculosa, a redução da reativação da doença, a diminuição do tempo de tratamento e o desenvolvimento de esquemas terapêuticos mais eficazes e menos agressivos. O sucesso no desenvolvimento de tais medidas depende de um maior conhecimento da interação micobactéria-hospedeiro no sítio de infecção tuberculosa. O rápido surgimento de cepas multi- e pan-resistentes e as epidemias verificadas nos últimos anos com tais cepas (FARMER, 2001) torna temerário o investimento apenas na quimioprofilaxia e tratamento dos casos da doença como medida de escolha para o controle da infecção tuberculosa. Por outro lado, o custo do desenvolvimento de novas drogas contra a tuberculose, em contraste com o seu público-alvo (entre as camadas sócio-econômicas mais desfavorecidas, principalmente em países em desenvolvimento), desencoraja o engajamento de grandes companhias farmacêuticas (ORME, 2001b).

A nível governamental, é importante considerar outros aspectos de custo-benefício em termos de estratégia de escolha para o combate à tuberculose. O custo atual dos medicamentos fornecidos por seis meses a um paciente infectado com uma cepa de *M. tuberculosis* completamente susceptível às drogas de primeira linha varia de 11 a 30 dólares, em vários países em desenvolvimento (HORWITCH, 2000), e no Brasil custa R\$78,00 ao Ministério da Saúde (SEGATTO & DAFLON, 1999). O custo médio do tratamento completo pode aumentar em cerca de setenta vezes para um paciente resistente a rifampicina e isoniazida (HORWITCH, 2000). Estima-se que aproximadamente 35 a 45 milhões de brasileiros estejam infectados com o *M. tuberculosis*, e que surjam por ano cerca de 100 mil novos casos da doença (WHO,

2001). O gasto anual total com assistência em saúde per capita no Brasil em 1996 variou de 23 a 51 reais (R\$ 29,64 na Bahia, no ano considerado). Estima-se que a prevenção eficaz da tuberculose represente em média uma economia anual de US\$2.57 para cada homem latino-americano na faixa de 15 a 64 anos (e possíveis comunicantes por ele infectados) considerando apenas as despesas médicas evitadas; este valor sobe para US\$ 133.66 se for adicionado a este cálculo a perda de produtividade por doença (BISHAI & MERCER, 2001). Em comparação, uma ampola de vacina BCG custa R\$2,00 (www.novohamburgo.rs.gov.br). Estes dados justificam a realização de estudos nacionais para estimar a eficácia da vacinação BCG em nosso meio, bem como da proteção conferida por esquemas vacinais que possam aumentar a proteção conferida por essa vacina, a exemplo da revacinação de crianças em idade escolar.

Idealmente, uma vacina contra a tuberculose deve ter custo "suportável", eficácia superior à do BCG e/ou resultados mais homogêneos entre as regiões geográficas, e deve ser capaz de diminuir a transmissibilidade do bacilo. Outras características importantes seriam a possibilidade de aplicação como imunoterapia, segurança e eficácia para administração incluindo populações infectadas pelo HIV, a possibilidade de não interferir no discernimento entre os indivíduos vacinados e os infectados, e a possível associação com outras vacinas (multivalência). Em 1998 algumas vacinas contra a tuberculose, desenvolvidas com a participação de grupos da Inglaterra, Estados Unidos e Austrália, foram noticiadas em fase de ensaio pré-clínico de desenvolvimento (DOVE, 1998). No entanto, a avaliação de novas vacinas e estratégias vacinais traz problemas importantes. A grande percentagem de indivíduos que permanecem com uma infecção assintomática por toda a vida e o tempo envolvido na transição da fase "latente" para a doença ativa nos que desenvolvem a doença implicam a necessidade de grandes grupos, acompanhados por tempo prolongado, para o teste de novas vacinas

contra a tuberculose, e mais uma vez, portanto, considerações de custo-benefício. A substituição da vacinação BCG, com eficácia comprovada contra formas disseminadas da doença (as quais apresentam maior gravidade e acometem em grande parte as faixas etárias imunologicamente mais susceptíveis) por uma vacina experimental, é uma decisão eticamente difícil (ELLNER *et al*, 2000). A capacitação para a avaliação de novas estratégias vacinais possui portanto um papel de extrema relevância para o controle e eliminação da tuberculose. Neste contexto, as possibilidades de desenvolvimento de novas vacinas contra a tuberculose estão vinculadas ao desenvolvimento e estudo de modelos de proteção que reflitam a evolução da doença humana, e ao estabelecimento de marcadores de proteção que possam servir como padrão-ouro para avaliação a curto prazo da eficácia potencial de novas estratégias vacinais, antes de se submeter populações em risco de tuberculose a outra vacina que não a BCG.

1.3.1 DISSOCIAÇÃO ENTRE RESPONSABILIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E RESPOSTA PROTETORA CONTRA O *M. TUBERCULOSIS*

A responsividade ao teste tuberculínico está associada na literatura ao mesmo tempo à infecção por *M. tuberculosis* e a uma resposta imunológica protetora contra o bacilo (VALLISHAYEE *et al*, 1998; BARNES, 2001). Entre outros fatores, a reatividade ao PPD em indivíduos sem história de contato com pacientes tuberculosos e sem sintomas da doença encontra-se associada à vacinação com BCG na infância, conforme discutido anteriormente. Em uma meta-análise da literatura, a vacinação BCG estava associada à positividade ao teste tuberculínico especialmente em indivíduos testados até 15 anos após a administração da vacina (FITZGERALD *et al*, 2001).

A viragem tuberculínica induzida pela vacinação BCG tem sido associada à eficácia vacinal. Cepas que induzem elevada frequência de viragem tuberculínica têm sido consideradas mais imunogênicas (AL-KASSIMI *et al.*, 1995; KEMP *et al.*, 1996). A diminuição da responsividade ao PPD com o tempo decorrido após a administração vacinal foi relacionada à perda de eficácia da primo-vacinação com BCG (STERNE *et al.*, 1998; FINE *et al.*, 1999), e em países onde a vacinação BCG é preconizada, frequentemente se recomenda que indivíduos primo-vacinados com reação negativa ao PPD recebam um reforço da vacina (PENNA *et al.*, 2000; LEUNG *et al.*, 2001). Outros fatores que interferem na positividade ao PPD, entre os quais a idade de administração da vacina, a utilização de diferentes cepas vacinais e a exposição a micobactérias ambientais, também foram associados a variações na eficácia da vacinação BCG (RIEDER, 1999; MENZIES, 2000). Em um estudo comparativo da evolução de parâmetros imunológicos de resposta contra o *M. tuberculosis* entre as vias percutânea e intradérmica de vacinação com BCG, a maior frequência de viragem tuberculínica 2 meses após a administração da vacina nos indivíduos que receberam BCG intradérmica estava associada a maior capacidade linfoproliferativa específica e produção de IFN- γ ao lisado total de culturas de *M. tuberculosis* (KEMP *et al.*, 1996). Por outro lado, alguns trabalhos demonstram a presença de células responsivas *in vitro* à estimulação com PPD no sítio de infecção tuberculosa (LUKEY *et al.*, 1996; SCHWANDER *et al.*, 1998). Estes achados justificam a investigação da viragem tuberculínica como um possível marcador de indução de proteção contra a tuberculose, com a vantagem de que este método vem sendo aplicado em seres humanos há quase dois séculos, com efeitos bem conhecidos e estudados.

Por outro lado, alguns estudos apontam para uma dissociação entre a frequência ou intensidade de conversão ao teste tuberculínico e a proteção conferida pela vacinação

BCG. Em um estudo realizado na Inglaterra, cepas de BCG com diferente frequência de indução de viragem tuberculínica oito semanas após a vacinação induziram redução semelhante na incidência de tuberculose em adolescentes vacinados, em comparação com a administração de placebo. No mesmo estudo, a incidência de tuberculose entre os indivíduos vacinados com cada cepa também foi independente da intensidade de reação ao teste tuberculínico. Na Arábia Saudita, uma cepa vacinal com baixa frequência de conversão ao teste tuberculínico foi capaz de induzir proteção significativa contra a tuberculose (MENZIES, 2000). Já na Dinamarca, a intensidade da reação ao teste tuberculínico não apresentou correlação com a dose de vacina administrada (MENZIES, 2000), em contraste com um estudo realizado no Senegal (GUERIN *et al*, 1999). Estas dificuldades podem ser especialmente importantes quando se considera a possibilidade de introdução de vacinas que codifiquem ou que sejam constituídas por antígenos micobacterianos selecionados, pois os clones de células T induzidos não necessariamente exibirão reatividade cruzada ou responderão *in vivo* promovendo a reação de hipersensibilidade tardia por estimulação com o PPD.

1.3.2 ABORDAGENS ALTERNATIVAS PARA A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NOVAS VACINAS CONTRA A TUBERCULOSE

A avaliação da produção de citocinas, ou da frequência de células T produtoras de citocinas, em especial do IFN- γ , por estimulação *in vitro* de culturas de sangue total com antígenos de *M. tuberculosis*, vem sendo desenvolvida como uma abordagem alternativa à utilização do teste tuberculínico para o diagnóstico da infecção tuberculosa (KATIAL *et al*, 2001; LALVANI *et al*, 2001). Tal abordagem pode permitir melhor distinção entre indivíduos infectados e indivíduos vacinados (JOHNSON *et al*, 1999;

MAZUREK *et al*, 2001), sendo portanto mais específica que o teste tuberculínico. Alguns autores têm proposto portanto que a avaliação da produção de IFN- γ ou a enumeração de células T antígeno-específicas em culturas de sangue total estimuladas com antígenos micobacterianos poderia ser utilizada também na avaliação de novas estratégias vacinais (ELLNER *et al*, 2000).

A dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas de sangue total apresenta especial facilidade de aplicação, já que requer pequeno volume de sangue e pode ser realizada em condições não estéreis em trabalho de campo, se padronizada para avaliação dentro de um curto período (van CREVEL *et al*, 1999). Alguns trabalhos mostram a produção de IFN- γ em culturas de sangue periférico de indivíduos vacinados com BCG, por estimulação *in vitro* com antígenos de *M. tuberculosis* (RAVN *et al*, 1997; MARCHANT *et al*, 1999). Não existem ainda estudos em populações vacinadas com BCG a respeito do comportamento da produção de IFN- γ ou de outros parâmetros imunológicos em culturas de sangue periférico antes e após a vacinação, nem de sua relação com eficácia vacinal.

Apesar de não ser essencial que um marcador de proteção esteja implicado em um mecanismo diretamente envolvido na eliminação do *M. tuberculosis*, é fácil imaginar que os mediadores que participam na resposta imunológica contra o bacilo e cuja variação é mensurável durante a infecção potencialmente serão candidatos de interesse para se avaliar a responsividade à vacina, principalmente aqueles que apresentem correlação com proteção durante a resolução da doença. A participação do IFN- γ , da IL-12, do TNF- α , da IL-6, da IL-4 e da IL-10 tem sido bastante estudada na resposta imune celular contra o *M. tuberculosis* em modelos experimentais e na infecção humana, e já existem trabalhos correlacionando a presença e/ou os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e

IL-4 com a severidade da doença tuberculosa (revisto em FLYNN & CHAN, 2001), pelo que tais citocinas podem se revelar úteis na avaliação da eficácia de novas estratégias vacinais.

1.4 Papel de mediadores solúveis na resposta imune protetora contra o *Mycobacterium tuberculosis*

A resposta imune contra o *M. tuberculosis* está centrada na ativação e potencialização dos mecanismos microbicidas de macrófagos infectados residentes no tecido ou recém-recrutados para o sítio de infecção, e na modulação destes processos de forma a minimizar o dano tecidual subsequente (MURRAY, 1999). O controle da infecção tuberculosa envolve portanto mediadores solúveis com capacidade de regular a resposta macrofágica e a reação inflamatória granulomatosa envolvida na contenção do bacilo.

O granuloma é formado em resposta à infecção micobacteriana, por células de diversos tipos celulares que circundam as células infectadas. A formação do granuloma é apresentada esquematicamente na Fig. 1 (DANNENBERG Jr. & ROOK, 1994). Em indivíduos sadios infectados com o *M. tuberculosis*, o granuloma primário é visualizável por radiografia no ápice pulmonar, limitado por fibrose e frequentemente calcificado (BROLIO & de LIMA-FILHO, 1982). Imagina-se que nestes indivíduos a resposta imune é eficaz contra o bacilo, permanecendo quer uma potente resposta de memória contra o *M. tuberculosis* após a eliminação da micobactéria, quer uma contínua contenção da infecção no sítio primário (SCHLUGER & ROM, 1998; ORME, 2001a).

Dentre as moléculas envolvidas na regulação da resposta anti-micobacteriana destacam-se (1) as quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento de células para formação do granuloma; (2) as citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, que induzem a expressão de moléculas de adesão, favorecendo o recrutamento de células, e atuam como co-estimulo para a ativação celular; (3) as citocinas ativadoras da resposta imune do tipo celular (ou Th1), que agem sobre o macrófago aumentando sua capacidade de eliminação do bacilo; e (4) as citocinas reguladoras da resposta macrofágica, capazes de modular negativamente a resposta Th1 e a produção de mediadores da resposta inflamatória (PAUL, 1998). A ação destes mediadores é discutida abaixo e está esquematizada na Fig. 1.

1.4.1 O IFN- γ COMO PRINCIPAL CITOCINA NA ATIVAÇÃO MACROFÁGICA

Os principais mecanismos envolvidos na eliminação dos bacilos intracelulares no macrófago são a liberação de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio, com destaque para a produção do óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e o fusão dos endossomas contendo o bacilo com lisossomas, levando à maturação do fagolisossoma (SCHLUGER & ROM, 1998; FLYNN & CHAN, 2001). A produção de reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio é dependente da atividade de enzimas, respectivamente a superóxido-dismutase e a óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), cuja síntese é estimulada na presença de IFN- γ , especialmente em sinergia com o TNF- α (BOEHM *et al.*, 1997). O IFN- γ inibe o crescimento intracelular do *M. tuberculosis* em macrófagos murinos (WALLIS & ELLNER, 1994), e em modelos experimentais murinos que tentam mimetizar a infecção humana latente foi demonstrado um papel essencial do IFN- γ , do TNF- α e da iNOS na prevenção da

reativação da doença tuberculosa (RAUPACH & KAUFMANN, 2001). O IFN- γ também é capaz de estimular a fusão fagossomo-lisossomo em células J774 infectadas com *M. bovis* (VIA *et al*, 1998). Camundongos deficientes de IFN- γ são os *knockouts* mais susceptíveis à infecção com *M. tuberculosis* H37Rv, e seres humanos deficientes em IFN- γ , no receptor para o IFN- γ ou em moléculas envolvidas na via de sinalização desta citocina apresentam elevada susceptibilidade a infecções com micobactérias atípicas e com o *M. tuberculosis* (SCHLUGER & ROM, 1998; FLYNN & CHAN, 2001). Em linfonodos de pacientes com tuberculose pulmonar os níveis de IFN- γ estão aumentados em relação a linfonodos controle, de indivíduos sem patologia no linfonodo (LIN *et al*, 1996; BERGERON *et al*, 1997). Níveis elevados de IFN- γ também estão presentes no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa, onde foram demonstrados maiores níveis da citocina e do mRNA para IFN- γ *ex vivo* no líquido pleural do que no sangue periférico dos mesmos pacientes (BARNES *et al*, 1993). Existe portanto uma concentração das células produtoras de IFN- γ no sítio da infecção durante a tuberculose pleural, considerada um pólo benigno no espectro da tuberculose (WALLIS & ELLNER, 1994). Isoladamente, no entanto, o IFN- γ não é suficiente para controlar a infecção tuberculosa, especialmente nos estudos focalizando a doença humana (FLYNN & CHAN, 2001).

1.4.2 PAPEL DOS MEDIADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Estudos com camundongos deficientes de ICAM-1 apontam para um papel fundamental da formação do granuloma no controle da infecção micobacteriana e contenção do bacilo (SAUNDERS *et al*, 1999). Embora alguns trabalhos demonstrem níveis elevados de quimiocinas como IL-8, MCP-1 e RANTES no lavado

broncoalveolar de pacientes com tuberculose pulmonar ativa ainda na ausência de tratamento (KURASHIMA *et al*, 1997; SADEK *et al*, 1998), pouco se sabe acerca do papel destas quimiocinas na imunopatogênese da doença. Alguns trabalhos sugerem um papel para as quimiocinas RANTES e IL-8 no recrutamento de linfócitos T com fenótipo de memória (CD45RO⁺) para o local da infecção (SADEK *et al*, 1998). A queda dos níveis de MCP-1 e RANTES foi correlacionada à diminuição da contagem de células T CD4⁺ por mililitro no lavado broncoalveolar de pacientes após nove meses de terapia anti-tuberculosa (KURASHIMA *et al*, 1997).

O estudo experimental da infecção de camundongos com *M. tuberculosis* sugere que a principal citocina envolvida na organização do granuloma é o TNF- α (MURRAY, 1999; FLYNN & CHAN, 2001). Na ausência desta citocina ou de seu receptor de 55 kDa, formam-se granulomas desorganizados, com menor frequência de macrófagos epitelióides e reduzida co-localização de macrófagos e linfócitos. O TNF- α estimula a produção de quimiocinas e influencia na expressão de moléculas de adesão e de receptores para quimiocinas, em sinergismo com as citocinas IL-1 e IL-6 (FLYNN & CHAN, 2001). O TNF- α também foi implicado na indução da apoptose em macrófagos murinos de linhagem infectados com *M. tuberculosis* (ROJAS *et al*, 1999). A indução de apoptose de macrófagos alveolares infectados com *M. tuberculosis* foi relacionada a um possível mecanismo de proteção contra o bacilo, já que estes macrófagos seriam caracterizados por um estado de supressão (e portanto incapacidade de eliminação do bacilo) e sua morte por apoptose permitiria liberar a micobactéria para fagocitose e eliminação intracelular em macrófagos ativados recrutados para o granuloma (KEANE *et al*, 1997, 2000).

O TNF- α também foi implicado na patogênese da tuberculose, em particular na exacerbação da necrose associada à resposta granulomatosa (COOPER & FLYNN, 1995). No modelo murino, onde os granulomas formados em resposta à micobactéria não apresentam necrose caseosa no animal imunocompetente (RHOADES *et al.*, 1997; ORME, 1998), alguns trabalhos indicam a exacerbação da necrose com a inibição desta citocina ou a deficiência do seu receptor (EHLERS *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2001), bem como em presença de quantidades aumentadas de TNF- α (BEKKER *et al.*, 2000). No homem, níveis aumentados de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias foram associados a maior extensão da doença pulmonar em pacientes com tuberculose (CASARINI *et al.*, 1999).

1.4.3 CITOCINAS ANTAGONISTAS DA RESPOSTA TH1 NA RESPOSTA ANTI-MICOBACTERIANA

A resposta contra patógenos intracelulares foi primeiramente dissecada no modelo murino em experimentos com *Leishmania major*, onde a produção de IFN- γ foi correlacionada à proteção contra a doença e a produção de IL-4 à sua exacerbação (HEINZEL *et al.*, 1989; SCOTT *et al.*, 1989). Posteriormente, outras citocinas foram relacionadas quer à potencialização da resposta celular neste modelo (a exemplo da IL-12) ou à sua modulação negativa (como a IL-5, a IL-13 e a IL-10), e estas respostas foram diferenciadas como padrões distintos de resposta imunológica, respectivamente o tipo Th1 e o tipo Th2. O antagonismo das citocinas IL-4 e IL-10 em relação à resposta ao IFN- γ foi reconhecido em outras infecções e a nível da sinalização intracelular (PAUL, 1998). No entanto, em relação à tuberculose, o papel das citocinas IL-4 e IL-10

ainda não foi bem esclarecido nem na infecção murina experimental, nem na doença humana (FLYNN & CHAN, 2001).

Surcel e colaboradores (SURCEL *et al*, 1994) mostram frequência aumentada de células capazes de produzir IL-4 em resposta ao antígeno solúvel de *M. tuberculosis* H37Rv e às proteínas micobacterianas de 38 e 19 kDa no sangue periférico de pacientes com várias formas de tuberculose, em relação a indivíduos PPD positivos. Van Crevel e colaboradores (van CREVEL *et al*, 2000) observaram a existência de correlação entre a presença de cavitações e percentagens mais elevadas de células produtoras de IL-4 no sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar, além de baixas percentagens de células produtoras de IL-4 em indivíduos PPD positivos, detectadas por citometria de fluxo após curta estimulação policlonal com forbol miristato acetato (PMA) e ionomicina. No entanto, em outro estudo, a comparação de pacientes com tuberculose pulmonar e voluntários sadios PPD positivos quanto à expressão de RNA mensageiro para IL-4 e IL-13 em células mononucleares do sangue periférico ou células T CD4⁺ periféricas purificadas estimuladas com *M. tuberculosis* morto pelo calor não demonstrou diferenças entre estes grupos (ZHANG *et al*, 1995). Além disso, a frequência de células produtoras de IL-4 no lavado broncoalveolar, em resposta ao PPD ou ao complexo proteico antígeno 85 (do filtrado do sobrenadante da cultura de *M. tuberculosis* H37Rv), determinada por ELISPOT, foi inferior a uma célula em dez mil, tanto em pacientes com tuberculose pulmonar como em voluntários sadios PPD positivos, e novamente não houve diferenças significativas entre os dois grupos (SCHWANDER *et al*, 1998). Bergeron e colaboradores (BERGERON *et al*, 1997), estudando a presença de RNA mensageiro para citocinas em linfonodos de pacientes com tuberculose, relatam que a presença de níveis detectáveis de mRNA para IL-4 e/ou IL-5 só foi possível nos linfonodos "que estavam completamente substituídos por lesões granulomatosas", e que

a produção de níveis detectáveis de mRNA para IL-4 e IL-5 não estava associada a uma redução dos níveis de mRNA para citocinas do tipo Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- β) nas amostras destes pacientes. Por outro lado, a comparação dos níveis de mRNA para citocinas entre linfonodos de pacientes com tuberculose pulmonar e linfonodos controles, de pacientes sem patologia no linfonodo, mostrou níveis mais elevados de mRNA para IL-4 nos linfonodos controles, o oposto do observado para IFN- γ (LIN *et al*, 1996).

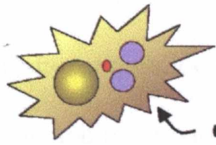
A proliferação de células do líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa face à estimulação com antígeno total de *M. tuberculosis* apresenta uma correlação negativa com os níveis de IL-10 detectados nos sobrenadantes de cultura (ARRUDA *et al*, 1998). Alguns trabalhos demonstram um papel para a IL-10 na exacerbação da doença (JACOBS *et al*, 2000). Boussiotis e colaboradores (BOUSSIOTIS *et al*, 2000), comparando pacientes com tuberculose pulmonar anérgicos ao teste tuberculínico com pacientes não anérgicos, mostraram que o estado anérgico estava associado à produção de IL-10 antes e após estimulação com PPD e à ausência de produção de IFN- γ por células T do sangue periférico destes pacientes após desafio com este antígeno específico, e que a baixa proliferação *in vitro* ao PPD, aloantígeno ou estímulo policlonal das células do sangue periférico podia ser revertida pela adição de anticorpos anti-IL-10. Apesar disso, no mesmo trabalho os autores demonstram que há produção de IL-10 por células T do sangue periférico de pacientes não anérgicos, porém em contraste com o observado para os pacientes anérgicos esta produção só ocorre após estimulação antigênica. Em concordância com estes resultados, Zhang e colaboradores (ZHANG *et al*, 1995), comparando pacientes com tuberculose pulmonar e doadores saudáveis com reação ao teste tuberculínico quanto aos níveis de mRNA e de produção de citocinas por estimulação *in vitro* de células do sangue periférico ou células T CD4⁺

purificadas, mostram produção equivalente de IL-4 e IL-10 nestes grupos, embora haja uma menor produção de IFN- γ e de IL-2 pelos pacientes com tuberculose pulmonar. Já a expressão de mRNA para IL-10 em linfonodos de pacientes com tuberculose pulmonar foi aproximadamente o dobro da encontrada em linfonodos de pacientes sem patologia no linfonodo; porém, os níveis de expressão de mRNA para IFN- γ são três vezes maiores nos pacientes com tuberculose pulmonar do que nos controles, e a avaliação dos linfonodos de pacientes com tuberculose pulmonar HIV positivos mostra níveis ainda mais altos de IL-10, sem diminuição da expressão de mRNA para IFN- γ (LIN *et al*, 1996). Por outro lado, no lavado broncoalveolar de pacientes com tuberculose pulmonar, os níveis de IL-10 medidos diretamente ou por estimulação das células do lavado com PPD, bem como a frequência de células produtoras de IL-10 por estimulação das células com PPD ou complexo proteico antígeno 85 demonstram respostas equivalentes às observadas em voluntários sadios PPD positivos (SCHWANDER *et al*, 1998).

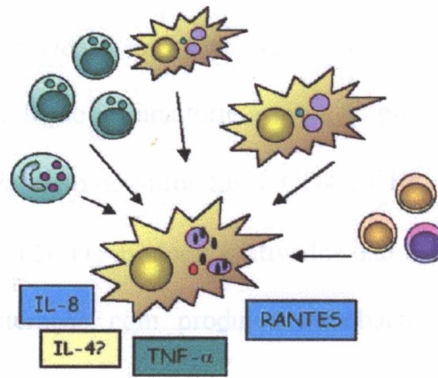
Alguns estudos evidenciam um possível papel regulatório para a IL-10 na prevenção do dano tissular a nível da resposta granulomatosa (MURRAY, 1999; MURRAY & YOUNG, 1999). A prevenção da necrose exacerbada pode contribuir para a contenção do bacilo no granuloma primário, e poderia constituir um dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da infecção latente assintomática verificada em cerca de 90% dos indivíduos portadores do *M. tuberculosis*.

No presente trabalho, nós apresentamos o estudo das alterações da produção de mediadores da resposta imunológica em dois modelos humanos de proteção contra a tuberculose: a cura sintomática espontânea da tuberculose pleural e o reforço da imunização com a vacina corrente, o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Desta forma,

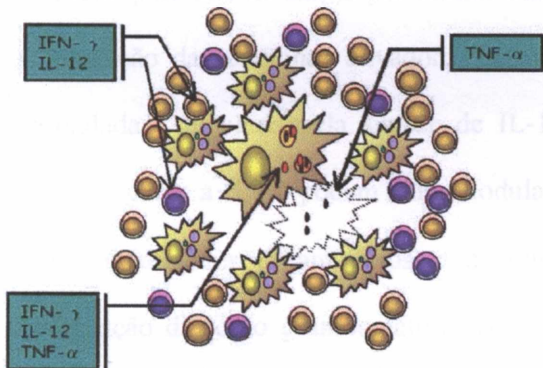
procuramos identificar marcadores imunológicos possivelmente associados à proteção contra a tuberculose humana, a serem investigados como parâmetros em potencial para a avaliação de novas estratégias vacinais e abordagens imunoterapêuticas.



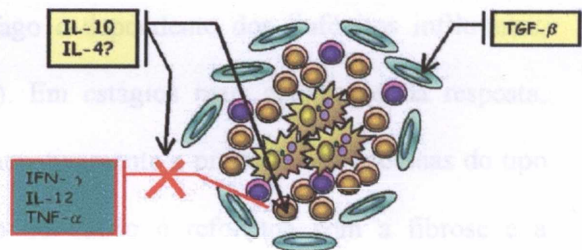
1. INFECÇÃO



2. FORMAÇÃO DO GRANULOMA



3. CONTENÇÃO DO BACILO E RESPOSTA IMUNE



4. MODULAÇÃO DA RESPOSTA E RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

Fig. 1. Formação do granuloma e resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Após a infecção de macrófagos alveolares (1), componentes bacterianos, peptídeos do sistema complemento e citocinas pró-inflamatórias produzidas no sítio de infecção atraem polimorfonucleares e monócitos que amplificam o processo inflamatório através da produção de IL-1, IL-6, TNF- α e quimiocinas, levando ao recrutamento de linfócitos T CD4 e CD8, células NK e outros monócitos a partir do sangue periférico (2). Os monócitos ativados dão origem às células epitelióides no local da infecção, por interação com produtos micobacterianos e citocinas como o IFN- γ e o TNF- α ; já os macrófagos infectados podem ser ativados por estas citocinas para a eliminação do bacilo ou sofrer apoptose mediada por TNF- α , com a liberação do bacilo para internalização por células com maior capacidade de eliminação da micobactéria. A produção das citocinas ativadoras do macrófago é dependente dos linfócitos infiltrantes, estimulada e regulada pela síntese de IL-12 (3). Em estágios mais avançados da resposta, citocinas como a IL-10 podem atuar modulando negativamente a produção de citocinas do tipo Th1 e mediadores inflamatórios, e a contenção do bacilo é reforçada com a fibrose e a calcificação da lesão granulomatosa, com a participação de fibroblastos e possivelmente do TGF- β (4).

2 INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE MEDIADORES SOLÚVEIS EM MODELOS HUMANOS DE RESPOSTA PROTETORA CONTRA O *M. TUBERCULOSIS*

O conhecimento atual acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos na eliminação das micobactérias e controle da infecção permite a proposição de potenciais marcadores imunológicos de proteção contra a tuberculose. Entre eles, estão a conversão do teste tuberculínico, e avaliações *in vitro* da resposta imunológica, com destaque para a mensuração da produção de citocinas e da indução de células T de memória / antígeno-específicas por estimulação de culturas de sangue periférico com antígenos micobacterianos (ELLNER *et al*, 2000). Parte do conhecimento atual da resposta imune envolvida no combate ao *M. tuberculosis* deriva de estudos *in vitro* ou da exploração de modelos experimentais, especialmente da infecção murina. A extrapolação de resultados obtidos com tais modelos para a resposta imunológica humana em qualquer investigação deve ser realizada com cautela. No caso da tuberculose, entretanto, deve-se considerar especialmente (1) o fato de que a resposta ao bacilo se produz no contexto de uma estrutura organizada, composta por múltiplos tipos celulares, que não é reproduzida na infecção *in vitro*; e (2) as diferenças importantes entre a resposta murina e a resposta humana apontadas por vários estudos, principalmente quanto à importância da indução do óxido nítrico para a eliminação da micobactéria e quanto à organização e evolução da resposta granulomatosa (revistos em

ORME, 1998; MURRAY, 1999; FLYNN & CHAN, 2001). É de especial interesse portanto a exploração de modelos *in vivo* ou *ex vivo* que permitam inferir mecanismos potencialmente envolvidos na resposta imunológica contra o bacilo na tuberculose humana.

Em nosso país, o excesso de demanda encontrado nos poucos locais de atendimento da rede pública de saúde à população e a falta de capacidade para o atendimento dos casos de tuberculose ao nível comunitário reflete-se no redirecionamento de grande parte destes pacientes para os centros de referência. Este fato, aliado à regressão espontânea dos sintomas nos pacientes com tuberculose pleural, contribui para que se observe em nosso meio um longo período entre a suspeita e o diagnóstico da doença. Esta forma da tuberculose é associada a uma resposta imunológica eficaz contra o *M. tuberculosis*, dada a elevada proporção de pacientes que cursam espontaneamente com regressão dos sintomas e mesmo cura momentânea (ROPER & WARING, 1955). No estudo descrito no Manuscrito I, tivemos a oportunidade de avaliar o comportamento dos níveis de citocinas, relacionadas na literatura à resposta contra o bacilo, no sítio da infecção, em pacientes com tuberculose pleural apresentando variado tempo de doença, e caracterização clínica desde doença ativa à regressão dos sintomas. Este manuscrito foi submetido à apreciação pelo corpo editorial da revista "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine".

A observação dos parâmetros imunológicos de variação mensurável durante a resolução da doença tuberculosa sugere alguns mediadores potencialmente envolvidos direta ou indiretamente em mecanismos associados ao combate à micobactéria. O estudo da evolução da produção potencial destes mesmos mediadores em resposta a antígenos micobacterianos, no contexto do reforço de uma resposta de memória induzida pela primo-vacinação com o BCG, leva-nos a sugerir com mais segurança

potenciais marcadores de proteção que possam ser utilizados para estimar a eficácia de novas estratégias vacinais ou abordagens imunoterapêuticas, além de permitir a avaliação de sua aplicabilidade em populações suficientemente representativas. Neste contexto, nós tivemos a oportunidade de avaliar a influência da revacinação com o BCG sobre a responsividade *in vitro* e *in vivo* de cento e trinta e seis crianças na faixa etária escolar (de sete a quinze anos) a antígenos micobacterianos, como um sub-projeto na avaliação da eficácia da administração de uma segunda dose de vacina BCG em escolares no Brasil, realizada pelo Instituto de Saúde Coletiva, sob a coordenação do Prof. Dr. Maurício L. Barreto, em colaboração com a Escola de Higiene e Medicina Tropical de Londres. O manuscrito aqui apresentado foi formatado para submissão ao corpo editorial da revista "Vaccine".

2.1 Objetivos dos estudos realizados

Nos trabalhos aqui apresentados, nós buscamos caracterizar o papel de mediadores solúveis envolvidos na resposta imune em dois modelos de proteção contra o *Mycobacterium tuberculosis*: a tuberculose pleural e a revacinação com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), esperando sugerir marcadores imunológicos potencialmente correlacionados a mecanismos de proteção contra a tuberculose que possam ser utilizados como parâmetros de avaliação no desenvolvimento de novas estratégias vacinais e abordagens imunoterapêuticas.

Como objetivos específicos em cada um destes estudos, destacamos:

1. Avaliação de pacientes com tuberculose pleural:
 - (a) Determinar o perfil de mediadores pró-inflamatórios e moduladores da resposta imune celular no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa, correlacionando-o com a fase clínica da doença (ativa ou regressiva).
 - (b) Caracterizar as células presentes no líquido pleural quanto ao seu estado de ativação, e verificar possíveis correlações com os níveis *in situ* de citocinas moduladoras da resposta imune celular.
2. Avaliação de escolares re-vacinados com BCG:
 - (a) Avaliar a produção pré- e pós-vacinação de citocinas envolvidas na resposta contra o *Mycobacterium tuberculosis* por estimulação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico com antígeno específico.
 - (b) Correlacionar esta resposta a outros mecanismos indicadores da imunidade celular, nomeadamente a intensidade de reação ao teste tuberculínico.

2.2 Manuscrito I:

Immunoregulation of Tuberculous Pleural Disease Evolution in the Absence of Chemotherapy

Theolis Barbosa (1), Sergio Arruda (1), Marcelo Chalhoub (2,3), Fabiano Oliveira (1,4), Jose F. Melo Jr. (1,4), Ramon Fidelis (4), Antonio N. Neto (4), Aryon A. Barbosa Jr. (1), Manoel Barral-Netto (1,4).

(1) Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ; Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001, Salvador, BA, Brazil. (2) Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil. (3) Hospital Octávio Mangabeira, Salvador, BA, Brazil. (4) Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil.

Corresponding author: Theolis Barbosa

Phone : +55 71 356 4320 ext.249 ; Fax: +55 71 356 2593. E-mail: theolis@cpqgm.fiocruz.br

This work was supported by CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development) grant number 521171/1998-9. TB, FO, JFMJr, RF and ANN received fellowships from CNPq.

Running title: Pleural response evolution in TB.

Descriptor numbers: 122. Tuberculosis: immune response; 94. Pleural Disease; 130. Lung infections: pathogenesis.

Word count (except abstract, figure/table legends and references): 2158

Pleural tuberculosis is often considered as benign, as patients can show clinical signs of disease regression without chemotherapy. Immune response is thought to play a role in this spontaneous "cure". We investigated the pleural cytokine and histopathological profile of non-treated tuberculous pleurisy patients with varied disease time and clinical presentation, to infer the behavior of *in situ* immune response during disease evolution. The levels of IL-10, IFN- γ and TNF- α in the pleural fluids analyzed decreased with disease time. IL-10 was positively correlated with IFN- γ , TNF- α and necrosis area in pleural sections, suggesting a possible down-regulatory role. To parallel these findings with resolution of the disease, two groups of patients with opposite clinical and radiological characteristics were distinguished. Individuals showing fever, anorexia, and progressive exudate in the pleural cavity (active stage) were compared with patients without symptoms and with regressive exudate (regressive stage). IFN- γ and TNF- α levels were lower in regressive stage, as well as necrosis area in pleural sections. Our results indicate that tissue destruction and a prominent Th1 response mark the initial phase of tuberculous pleurisy, and suggest that its down-modulation, with the possible participation of IL-10, is associated with disease resolution.

Keywords: Pleural tuberculosis; disease progression; cytokines; pathology.

Abstract word count : 193

INTRODUCTION

Tuberculosis remains as the major infectious cause of death worldwide. Approximately one third of the world's population is thought to be infected with its causal agent, *Mycobacterium tuberculosis*. However, the infection goes silent throughout lifetime in 90% of these individuals, what suggests an important role for the immune system in disease control (1).

Pleural tuberculosis occurs in 15 percent of disease cases and has been regarded in the literature as a positive response to *M. tuberculosis* infection (2). This form of tuberculosis is characterized by an extensive inflammatory exsudate to the pleural space, probably developing from the rupture of a caseous focus in the lung (3). Tuberculous pleurisy patients generally do not present concomitant pulmonary disease, and high rates of spontaneous regression of symptoms have been reported, although the majority of non-treated patients recidivates within five years of pleural disease "cure" (4).

The favorable pleural disease evolution has been related to the capacity of mounting an efficient immune response in the pleural compartment. Jones and colleagues (5) have shown that pleural tuberculosis is less frequent among HIV-positive patients with low blood CD4⁺ T cell counts, and that patients with AIDS and tuberculous pleuritis can develop well-formed pleural granulomas even when peripheral blood CD4⁺ T cell counts are below 200/ μ l. The tuberculous pleural fluid presents high percentages of CD4⁺ T cells with memory phenotype (6) which proliferate upon stimulation with mycobacterial antigens (7, 8); interestingly, chemotherapy enhances pleural fluid cell proliferation to PPD *in vitro* (9). The participation of these cells in the anti-mycobacterial response likely involves the production of protective cytokines. The pleural fluid is characterized by high levels of IFN- γ and other Th1 cytokines (10), which enhance mycobacterium killing by infected macrophages (11).

Our goal was to investigate how the pleural immune and histopathological parameters evolve in tuberculous pleurisy patients in the absence of chemotherapy, and therefore to understand

how the immune system may participate in disease control. Patients analyzed have sought medical care after varied disease time and were not left untreated for this study. We show that the initial stage of pleural tuberculosis is marked by tissue destruction and high levels of inflammatory and Th1 mediators, and suggest that disease resolution may be dependent on the control of the anti-mycobacterial response.

METHODS

Study population. Patients assisted in government health care facilities from Salvador (Bahia, Brazil), suspected of pleural disease, are routinely referred to the Octavio Mangabeira Hospital for diagnosis. We analyzed fifty-eight patients diagnosed with tuberculous pleurisy in this hospital. Diagnosis was based on clinical symptoms (fever, fatigue, anorexia, cough, dyspnea, and chest pain), X-ray findings and pleural biopsy (for all patients included we could demonstrate presence of chronic granulomatous pleuritis or granuloma). The study was approved by the hospital's ethical committee and by the ethical committee of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. The patients had not undergone chemotherapy before evaluation. Upon informed consent, pleural fluid samples were drawn into cryovials and immediately stored in liquid nitrogen until analysis. Exclusion criteria were recidivated tuberculosis, purulent pleural effusion, HIV-positive test or concomitant chronic disease (as diabetes, cirrhosis or renal failure). Previous BCG vaccination was inferred by presence of vaccine scar. Tuberculin test reactivity was assessed as induration at 48h.

Disease time determination. Disease time until thoracentesis was determined from patient interview, performed by trained personnel using a standard questionnaire. Pleural tuberculosis starts as an acute disease, marked by intense pleural pain (12). However, to increase our confidence in the accuracy of patient information, we have questioned the patients about the time of onset for each relevant symptom separately (fever, fatigue, anorexia, cough, dyspnea,

and chest pain), and confronted with the referred disease time, with special regard to pleural pain.

Soluble mediators levels. Cytokines and soluble IL-2 receptor (sIL-2R) were measured on the pleural fluid samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits: Duo-Set (Genzyme, Cambridge, MA), for IFN- γ , TNF- α , total IL-12, IL-5, IL-8, total (acidified) TGF- β and sIL-2R; Human IL-12p40 (Pharmingen, San Diego, CA), for IL-12p40 levels; and Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN), for IL-10. Pearson's linear regression and Spearman correlation analyses were performed using GraphPad Prism v 3.00 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

Clinical stages of disease. Stage differentiation was based on the following parameters: active stage, patients with progressing or stable pleural exsudate in the last fifteen days, fever, anorexia and weight loss; regressive stage, patients with involution of pleural exsudate and without symptoms for at least five days. According to these criteria, 35 clinically well-defined patients were identified in this study. For the active stage group, the median period between the first and the last X-ray evaluation was of 8.5 days (range, 5 to 16 days), and for the regressive group, 15 days (range, 6 to 33). Active and regressive patients were compared using the Mann-Whitney test. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism.

Histopathological analysis. Pleural biopsies from acute and regressive stage individuals were analyzed in blind evaluations to determine the amount of necrosis and fibrosis in the sampled pleural tissue. Only the sections containing a minimum of four fragments of pleural tissue, taken at different insertions of the Cope's needle in the pleura, were considered. Four cases with insufficient material for analysis were excluded. Necrotic tissue area in hematoxylin-eosin stained pleural sections was determined by semiautomatic morphometry from pleural area in all fragments (normalized to 10mm²) and transformed in percent pleural necrosis using the Leica Q500MC Image Processing and Analysis System (Leica Cambridge, Cambridge,

England). The same sections were evaluated independently by two experienced pathologists regarding the intensity of the fibrosis present. The pathologists were asked to assign a total grade of fibrosis for patient pleuritis, ranging from 0 to +++ (Box 1). The extent of necrosis and fibrosis in acute versus regressive patients sections were compared through the Mann-Whitney test. Necrosis percentages and fibrosis grades were also correlated to disease time and cytokine levels using Spearman correlation analysis. Data were treated using GraphPad Prism.

RESULTS

Fifty-eight HIV-negative tuberculous pleurisy patients have participated of our study. None of the patients had initiated specific chemotherapy before thoracentesis. Ages averaged 31.4 with a standard deviation of 11.6 years, and male to female ratio was 32:26. Suggestive BCG (Bacille of Calmette-Guérin) vaccination scar was found in 45.2 % of the individuals, and 70.7 % of the subjects presented tuberculin reactivity (reaction diameter above 5mm). No differences were found between sexes for any of the parameters analyzed in this study. Surprisingly, vaccinated subjects presented lower levels of IL-8 in the pleural fluid when compared with non-vaccinated individuals ($p=0.01$). Time of disease showed a wide variation (median of four weeks; range, 1 to 32 weeks). Cytokine and soluble IL-2 receptor (sIL-2R) mean levels for the population analyzed are shown in Table 1. Our results were comparable with previous findings in the literature for IL-8 (13, 14), TNF- α (15), sIL-2R (16), IFN- γ (10, 15), IL-5 (10), IL-10 (10) and IL-12p40 (17). Total IL-12 levels were higher than reported (values of 585 ± 89 pg/ml (17)), as well as total TGF- β levels (144 ± 77 pg/ml (18)). Pleural fluid levels of immune soluble molecules and disease time were correlated to analyze the changes of *in situ* immune response during disease evolution. IL-10 was found to significantly decrease with disease time ($p= 0.04$, Fig. 1A). TNF- α and IFN- γ levels

decreased with disease time, but the analysis performed did not reach statistical significance (p values of 0.06 and 0.06, Spearman coefficient of -0.26 and -0.27 , respectively). $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IFN-}\gamma$ were both positively correlated with IL-10 levels (Fig. 1 B and C; p values of 0.01 and 0.04, Spearman coefficient of 0.36 and 0.28, respectively).

To help clarify the behavior and possible roles of the immune response in the spontaneous regression of clinical symptoms, “active” and “regressive” stage pleural tuberculosis patients were distinguished in the population studied, based on clinical and radiological findings. Reported disease duration varied widely between individuals classified in active disease (median of two weeks, range, 1 to 32 weeks), while regressive stage patients were more homogeneous and had significantly higher disease duration (median of four weeks, range of 3 to 12 weeks; $p=0.01$, Mann-Whitney test). No significant differences were found between active versus regressive disease groups in terms of age or sex. They have also presented equivalent proportions of BCG vaccinated versus non-vaccinated individuals and tuberculin reactive versus tuberculin anergic subjects. Of all mediators analyzed (Table 1), only $\text{IFN-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$ have been detected in significantly different amounts in active versus regressive stage individuals ($p\leq 0.01$, Mann-Whitney test; Table 1 and Fig. 2). IL-10 levels tended to be lower in regressive stage individuals, but the difference has not reached significance ($p=0.06$, Mann-Whitney test).

Effective control of mycobacterial infection involves contention of bacilli and killing of infected macrophages by activated macrophages and lymphocytes recruited to the site of infection, that form organized structures – the granulomas. Resolution of granulomatous lesions is accompanied by scarring with collagen deposition by fibroblasts on the periphery of granulomas. Necrosis and fibrosis extent in pleural granulomas have therefore often been associated both to disease progression and the operating cytokine network (19-21). The percentages of necrotic area and fibrosis grades in pleural granulomas were compared

between acute and regressive stage individuals. and were also correlated with disease time and the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-8 and TGF- β . The extent of necrosis has differed between the clinical groups defined ($p=0.05$, Fig 3A), and has also shown a positive correlation with IL-10 levels ($p=0.05$, Spearman $r= 0.38$, Fig.3B). On the other hand, fibrosis extent presented a strong negative correlation with TNF- α ($p=0.005$, Spearman $r = -0.50$) and IL-10 levels ($p=0.001$, Spearman $r = -0.59$, Fig 4). Fibrosis grades have also shown a positive correlation with time of disease ($p=0.05$, Spearman $r = 0.38$), as expected considering its relation with inflammation decline.

DISCUSSION

The pleural immune response in tuberculous pleurisy patients is characterized by the development of a marked Th1 environment. IFN- γ , TNF- α and IL-12 levels are elevated in tuberculous pleural fluid (15, 17) and are highly correlated to each other (data not shown). The importance of Th1 cytokines in the containment of *M. tuberculosis* infection has been extensively demonstrated (reviewed in (2, 11, 22)).

We have observed a decrease of IFN- γ and TNF- α levels during disease evolution, as assessed by the correlation with disease time and pleural fibrosis extent. This observation could reflect the inclusion of patients with an impaired response against tuberculous infection among the individuals with higher disease duration. We have therefore compared cytokine levels in two polar groups (active versus regressive), defined on the basis of clinical and radiological parameters suggestive of disease control. The regressive group presented significantly higher disease duration when compared with the active stage group, but did not include the patients with longer disease time (above 12 weeks). TNF- α and IFN- γ pleural fluid levels were diminished in the regressive stage group.

The down-regulation of the anti-mycobacterial response could have a role in the clinical resolution of pleural tuberculosis. It has been shown in the murine model that the TNF- α produced in response to infection contributes to exacerbate local tissue damage (23). Also the down-modulation of TNF- α response by thalidomide treatment of infected mice reduces the extent of necrosis in pulmonary granulomas without effects on bacillary load (24). Pulmonary tuberculosis patients progressively decrease the levels of TNF- α in the bronchoalveolar fluid after 6 and 12 months of chemotherapy (19), and in severe tuberculosis patients the increase in TNF- α plasma levels was associated with clinical deterioration in the beginning of treatment (25).

In accordance with this view, we have observed that the decreased IFN- γ and TNF- α levels were paralleled by a reduced percentage of pleural necrosis extent in the patients classified in the regressive stage group. We have also observed that IL-10 correlated positively with the extent of pleural necrosis, and with the levels of TNF- α and IFN- γ . IL-10 levels were also found to decrease with disease time and fibrosis grades. IL-10 is a macrophage-deactivating cytokine that has been implicated as a possible anergizing factor in tuberculosis (26, 27). However, Boussiotis and colleagues (28) suggest that the anergic condition would rather be characterized by a persistent IL-10 response allied to low IFN- γ levels, instead of by the production of IL-10 itself. We suggest that IL-10 may be induced in the early stage of disease in response to chronic inflammation and Th1 cytokine levels, and could be responsible for preventing exacerbated tissue damage in tuberculous pleurisy by modulating the microbicidal immune response.

Pleural tuberculosis in non-immune compromised patients is a paucibacillary, benign form of disease. Immune response silencing and inflammation resolution may be critical steps for the development of an asymptomatic infection, characteristic of the majority of *M. tuberculosis*-

bearing individuals. Our results support a role for the down-modulation of Th1 pleural response in clinical disease resolution, with the possible participation of IL-10.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Margarida Pompeu, Dr. João Santana and Dr. John Ho for helpful suggestions, to Dr. Eduardo Ramos and Dr. Washington L. Conrado dos Santos for expert assistance, and to Mr. Jorge Tolentino, Mrs. Sílvia Cardoso, and Mrs. Cristina dos Santos Mota for technical help.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2000. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000. WHO/CDS/TB/2000.275.
2. Wallis RS, Ellner JJ. Cytokines and tuberculosis. *J Leukoc Biol* 1994;55:676-81.
3. Berger HW, Mejia E. Tuberculous pleurisy. *Chest* 1973;63:88-92.
4. Roper WH, Waring JJ. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. *Am Rev Tuberc* 1955;71:616-34.
5. Jones BE, Young SMM, Antoniskis Dea. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell count in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1292-7.
6. Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH, Modlin RL. Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1989;142:1114-9.
7. Lukey PT, Latouf SE, Ress SR. Memory lymphocytes from tuberculous effusions: purified protein derivative (PPD) stimulates accelerated activation marker expression and cell cycle progression. *Clin Exp Immunol* 1996;104:412-8.
8. Wilkinson RJ, Vordermeier HM, Wilkinson KA, Sjolund A, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J. Peptide-specific T cell response to Mycobacterium tuberculosis: clinical spectrum, compartmentalization, and effect of chemotherapy. *J Infect Dis* 1998;178:760-8.
9. Ainslie GM, Solomon JA, Bateman ED. Lymphocyte and lymphocyte subset numbers in blood and in bronchoalveolar lavage and pleural fluid in various forms of human pulmonary tuberculosis at presentation and during recovery. *Thorax* 1993;47:513-8.
10. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993;61:3482-9.

11. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:679-91.
12. Levine H, Szanto PB, Cugell DW. Tuberculous pleurisy. *Arch Intern Med* 1968;122:329-32.
13. Dlugovitzky D, Rateni L, Torres-Morales A, Ruiz-Silva J, Pinesky R, Canosa B, Molteni O, Bottasso O. Levels of interleukin-8 in tuberculous pleurisy and the profile of immunocompetent cells in pleural and peripheral compartments. *Immunol Lett* 1997;55:35-9.
14. Segura RS, Alegre J, Varela E, Marti R, Surinach JM, Jufresa J, Armadans L, Pascual C, de Sevilla TF. Interleukin-8 and markers of neutrophil degranulation in pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1565-72.
15. Maeda J, Ueki N, Ohkawa T, Iwahashi N, Nakano T, Hada T, Higashino K. Local production and localization of transforming growth factor-beta in tuberculous pleurisy. *Clin Exp Immunol* 1993;92:32-8.
16. Ito M, Kojiro N, Shirasaka T, Moriwaki Y, Tachibana I, Kokubu T. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in tuberculous pleural effusions. *Chest* 1990;97:1141-3.
17. Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994;93:1733-9.
18. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, Britton S. Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol* 2001;53:85-91.
19. Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:729-35.
20. de Pablo A, Villena V, Echave-Sustaeta J, Encuentra AL. Are pleural fluid parameters related to the development of residual pleural thickening in tuberculosis? *Chest* 1997;112:1293-7.

21. van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg B-J, Nelwan RHH, van der Meer JWM. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 2000;181:1194-7.
22. Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol* 1999;7:366-72.
23. Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun* 2000;68:6954-61.
24. Moreira AL, Tsenova-Berkova L, Wang J, Laochumroonvorapong P, Freeman S, Freedman VH, Kaplan G. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1997;78:47-55.
25. Bekker LG, Maartens G, Steyn L, Kaplan G. Selective increase in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis* 1998;178:580-4.
26. Bermudez LE, Champisi J. Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of an anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. *Infect Immun* 1993;61:3093-7.
27. Ellner JJ. Regulation of the human immune response during tuberculosis. *J Lab Clin Med* 1997;130:469-75.
28. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes J-M, Godfeld AE. IL-10 producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000;105:1317-25.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Correlations between IL-10 and (A) disease time, (B) IFN- γ , and (C) TNF- α levels in pleural fluids from tuberculous pleurisy patients.

Fig. 2. IFN- γ (A) and TNF- α (B) levels in pleural fluids of active stage (open squares) versus regressive stage (solid squares) tuberculous pleurisy patients. Horizontal bars indicate the median for each group.

Fig. 3. Percent necrosis area (% necrosis) in pleural biopsies from tuberculous pleurisy patients. A, Comparison between active stage (open squares) versus regressive stage (solid squares) individuals. Horizontal bars indicate the median for each group. B, Correlation between percent necrosis area and IL-10 levels in pleural fluid.

Fig. 4. Correlation between fibrosis extent grades in pleural biopsies and IL-10 levels in pleural fluid from tuberculous pleurisy patients.

Box 1. Fibrosis grade assignment in pleural biopsy sections from tuberculous pleurisy patients.

Aspect	Grade description
0	Absent
+	Minor feature, restricted to inflammatory areas
++	Dominant feature, at inflammatory areas or external adjacent areas
+++	Widespread, including non-inflammatory areas and muscle

Table 1. Soluble mediators present in pleural fluid from tuberculous pleurisy patients according with clinical classification.

Disease stage	Recr.*	Inflammatory		Th1		Th2	Regulatory		
	IL-8	TNF- α	sIL-2R	IFN- γ	IL-12	IL-5	TGF- β	IL-10	IL-12p
Active (n=20)	177.97 \pm 148.40	27.02[‡] \pm 12.03	6963.80 \pm 1460.25	1387.94[‡] \pm 518.47	1396.11 \pm 638.67	0 [0-500]	745.91 \pm 661.78	101.40 \pm 54.23	569.33 \pm 238.1
Regressive (n=15)	232.30 \pm 239.62	14.00[‡] \pm 11.96	7241.71 \pm 3991.02	779.61[‡] \pm 753.53	1240.25 \pm 418.38	0 [0-0]	661.93 \pm 646.64	65.21 \pm 33.09	670.51 \pm 307.2
Total [†] (n=58)	186.72 \pm 178.09	21.49 \pm 12.19	7679.83 \pm 3407.42	1093.43 \pm 665.78	1219.75 \pm 573.29	0 [0-500]	761.52 \pm 633.39	83.70 \pm 40.85	589.79 \pm 278.2

Cytokine levels are expressed in pg/ml. and represent mean values \pm standard deviation, except for IL-5 (media [minimum – maximum] values). * Recruitment. [†] Total = active + regressive + non-polar patients.

[‡] P<0.01 (Mann-Whitney test).

FIG. 1

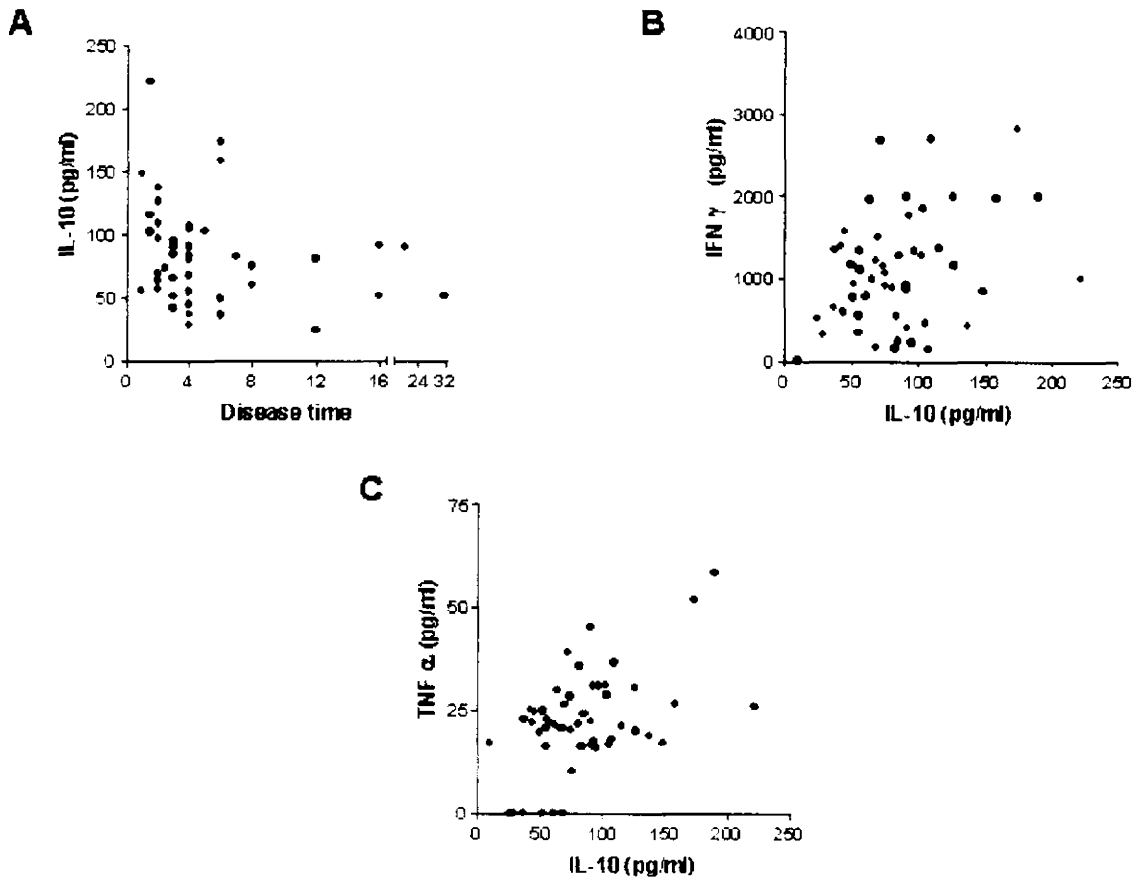


FIG. 2

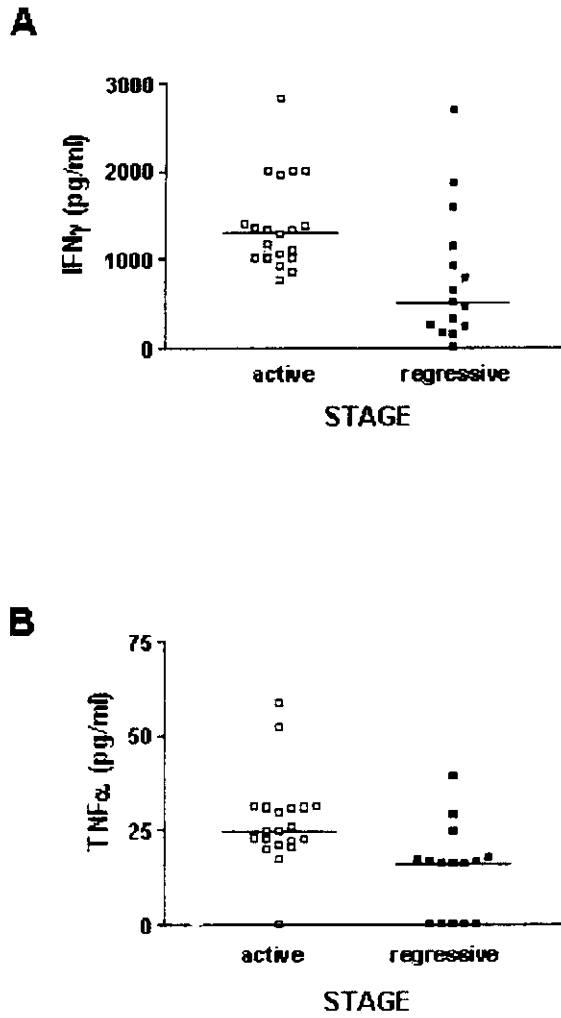


FIG. 3

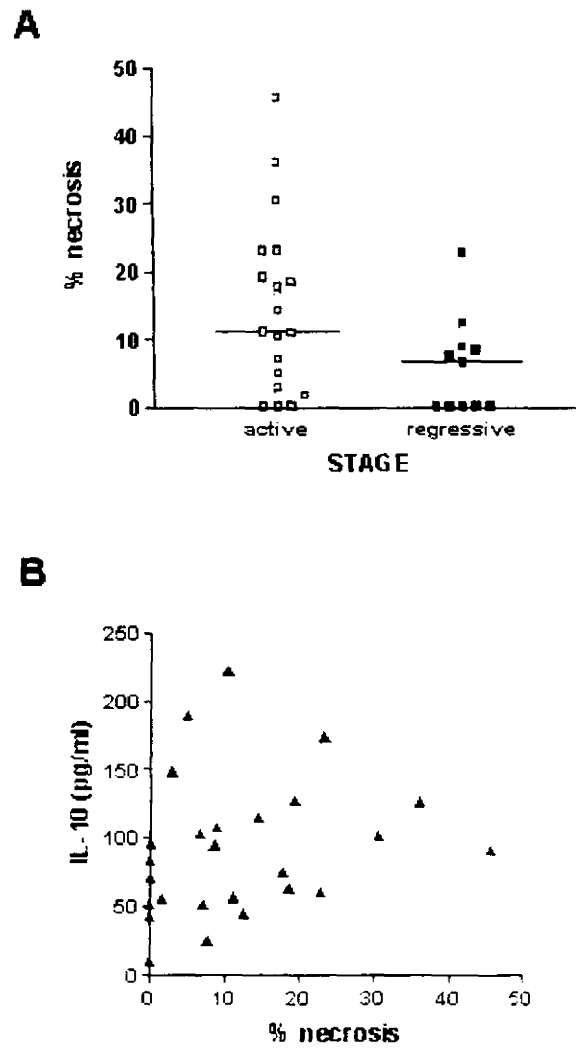
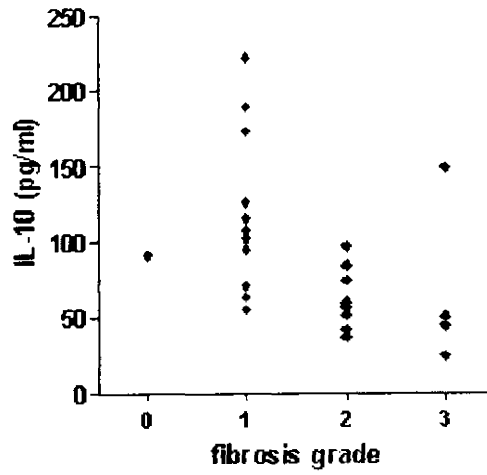


FIG. 4



2.2.1 NOTAS

Os níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-12 no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa apresentaram correlação significativa, indicando o desenvolvimento de uma resposta imune celular marcadamente Th1 no sítio da infecção, associada a uma importante ativação linfocitária, evidenciada pela presença de receptor solúvel de IL-2 (ITO *et al*, 1990) (Tabela 1). As correlações mais expressivas foram: TNF α com sIL-2R, IFN γ , IL-12 e IL-10; e IL-12 com IFN γ , sIL-2R e a subunidade IL-12p40. Outras correlações significativas incluíram: IL-10 com IL-8 (P= 0,0482) e IFN γ (P= 0,0390); e TGF β com IL-8 (P= 0,0212). A correlação negativa observada entre IL-8 e IL-10 pode ter resultado do comportamento bimodal desta última citocina com o tempo de doença.

Tabela 1. Matriz de correlação entre os níveis de citocinas no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa.

	IL-8	sIL-2R	TNF α	IFN γ	IL-12	TGF β	IL-10
IL-8	-						
sIL-2R	0,2297	-					
TNF α	0,1713	0,5703**	-				
IFN γ	0,3271*	0,4063	0,7661***	-			
IL-12	0,1666	0,5564*	0,4979***	0,3963**	-		
TGF β	0,3466*	0,0015	-0,0194	0,0711	-0,0506	-	
IL-10	-0,2781*	0,2931	0,3589**	0,2818*	0,1470	-0,2263	-
IL-12p40	-0,2169	0,3209	0,0028	-0,0595	0,5321**	0,0112	0,0537

Os valores representam o coeficiente de correlação de Spearman. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

A análise por citometria de fluxo das células do líquido pleural dos pacientes com pleurite tuberculosa avaliados neste estudo demonstrou uma concentração significativa de linfócitos T CD4⁺ no compartimento pleural em relação ao sangue de pacientes com pleurite

tuberculosa. Esta concentração dos linfócitos T CD4⁺ reflete principalmente um aumento no compartimento pleural das células que apresentam o fenótipo "de memória" (CD45RO⁺), resultados que estão de acordo com trabalhos anteriores na literatura (LUKEY *et al*, 1996). Diminuem significativamente no líquido pleural as células B (CD19⁺), bem como os linfócitos T CD8⁺, em especial os que apresentam o marcador CD45RA (indicativo de ausência de estimulação antigênica prévia). Observamos baixas percentagens de linfócitos T CD45RO⁺ expressando a cadeia alfa do receptor para IL-2 (CD25) nas células de oito pacientes (em amostras congeladas de líquido pleural). Estas percentagens foram mais baixas do que as percentagens verificadas para a mesma população no sangue. Contudo, as diferenças observadas não foram significativas e não podemos descartar a interferência do anticoagulante utilizado na detecção e/ou modulação do receptor. As demais populações celulares não apresentaram diferenças percentuais significativas entre o sangue e o líquido pleural. Também não houve diferenças percentuais significativas no líquido pleural em termos das populações de linfócitos T, B e NK, nas fases clínicas consideradas (ativa e regressiva). Observamos uma fraca correlação entre as percentagens de células CD4⁺/CD45RO⁺ e os níveis de IL-12 presentes no líquido pleural (P=0.02, r²=0.22; correlação linear de Pearson). Nenhuma outra correlação entre níveis de citocinas ou entre estes e as percentagens de subconjuntos celulares no líquido pleural foi observada. Estes resultados se contrapõem aos dados da literatura que sugerem a participação destas células na resposta anti-micobacteriana (AINSLIE *et al*, 1993; WILKINSON *et al*, 1998), e justificam uma investigação maior quanto ao possível papel das células T CD4⁺45RO⁺ do líquido pleural na resposta imune de pacientes com pleurite tuberculosa.

2.3 Manuscrito II:

BCG (Bacille of Calmette-Guérin) re-vaccination leads to improved *in vitro* IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children

Theolis Barbosa (1)[†], Sérgio Arruda (1,2), Bruno D. Fernandes (1), Lucas P. Carvalho (1), Silvia Cardoso (1,3), Sérgio Cunha (4), Maurício L. Barreto (4), Susan M. Pereira (4), Laura C. Rodrigues (5), Manoel Barral-Netto (1,3).

(1) Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ; Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001, Salvador, BA, Brazil. (2) Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil. (3) Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia; Salvador, BA, Brazil. (4) Instituto de Saúde Coletiva, UFBA; Salvador, BA, Brazil. (5) London School of Hygiene and Tropical Medicine; London, UK.

[†]Corresponding author.

Phone: +55 71 356 4320 ext.249; Fax: +55 71 356 2593. E-mail: theolis@cpqgm.fiocruz.br

Running title: Surrogates of protection in BCG re-vaccinated children.

Key words: BCG; re-vaccination; immunological markers; tuberculosis; immune response.

This work was supported by CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development), grant n. 521171/1998-9; FUNASA (National Health Foundation); DFID (Department for International Development, UK Government) and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). TB, BDF and LPC received fellowships from CNPq.

The development of a new vaccine with more reproducible efficacy against tuberculosis (TB) in substitution of the widely used Bacille of Calmette-Guérin (BCG) has been hampered by the lack of adequate animal models to assess protection against disease, and by the difficulties involved in the design of trials to estimate efficacy in exposed populations. The establishment of surrogate markers of protection against TB may facilitate the selection of new TB vaccine candidates. We have evaluated the evolution of potential immunological correlates of protection after BCG re-vaccination of Brazilian school-age children. Namely, we have studied the tuberculin skin test (TST) response and the cytokine production in finger-stab derived whole blood cultures stimulated with *M. tuberculosis* antigen. Prior to BCG re-vaccination, most of the evaluated children apparently retained the *in vitro* IFN- γ responsiveness to *M. tuberculosis* antigen conferred by neonatal BCG administration, in contrast with null TST response. BCG re-vaccination was able to boost the *in vitro* production of IFN- γ , especially in previously unresponsive children. No correlations were found between PPD responsiveness and *in vitro* cytokine production. Our data suggest that the IFN- γ *in vitro* responsiveness to mycobacterial antigens may be used as a candidate 'gold-standard' for the evaluation of new TB vaccines.

INTRODUCTION

Vaccination with the Bacilli of Calmette-Guérin (BCG) has long been applied worldwide to prevent tuberculosis (TB). The varied degrees of BCG protection estimated in several studies [1-3] have contributed for divergences as to the importance of BCG vaccine, and also public health policies for its use [4-6]. Substitute vaccines against TB have been proposed [7-10]. However, expensive trials with large numbers of tested individuals will be necessary to estimate their efficacy, given the small percentage of infected individuals that develop disease and the long time of asymptomatic infection in *M. tuberculosis*-bearing individuals [8,11]. Cost-benefit reasons, and ethical considerations regarding the substitution of the well-known BCG vaccine for a trial vaccine in large human populations subject to risk of tuberculosis, a disease relatively difficult to treat, constitute further constraints in TB vaccine development. The establishment of markers that would correlate with protection against the disease would largely facilitate the evaluation of candidate new TB vaccines.

The present knowledge about the immune mechanisms involved in mycobacterial killing and control of tuberculosis should lead to suggestions for candidate immunological surrogates of protection [12]. So far, the IFN- γ production in peripheral blood cultures stimulated with mycobacterial antigens, the induction of memory-type/antigen specific T cells, or the capacity of killing intracellular mycobacteria upon *in vitro* infection were shown to be augmented in tuberculosis patients that recover from disease after treatment completion [13], and in BCG vaccinated individuals [14]. Assuming an important role of memory-type responses in the control of mycobacterial infection, and given the enhanced protection conferred by BCG re-vaccination in populations where single-dose vaccination is effective [15,16], we may speculate that in re-vaccination settings potential immunological correlates of protection would undergo a similar booster effect.

BCG vaccination for children under 1 year is obligatory in Brazil since 1976, being usually administered to neonates [17]. The few studies available point to a protective effect of BCG neonatal vaccination against tuberculous meningitis in Brazil [18,19]. Based on these findings and in the assumptions from the literature that indicate a decline in the immune response conferred by BCG vaccination with age, the Brazilian Ministry of Health presently recommends the re-vaccination of Brazilian school-age children, [17,20]. In 1996, a large randomized controlled trial was initiated to estimate BCG re-vaccination efficacy against all forms of the disease, which is currently in progress. In this context, we addressed the evolution of candidate markers of protection against mycobacteria after BCG re-vaccination of Brazilian school-age children. Our evaluations included tuberculin skin test and the *in vitro* production of the cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-10 upon stimulation of whole blood cultures with *Mycobacterium tuberculosis* crude antigen. We show that children initially with poor IFN- γ *in vitro* responsiveness to mycobacterial antigen presented a significant increase of IFN- γ production after BCG re-vaccination. Also a significant drop was seen in TNF- α *in vitro* responsiveness for the population evaluated. These findings would be in agreement with the current view that a Th1-type response with controlled production of potentially damaging cytokines would lead to protective immunity against tuberculosis. Our results suggest a possible beneficial effect of BCG re-vaccination in Brazilian school age children, and corroborate the feasibility and value of the measurement of cytokines in whole-blood cultures stimulated with mycobacterial antigens for the evaluation of candidate TB vaccines.

METHODS

Blood collection, tuberculin test and BCG re-vaccination. This study was performed in the context of an ongoing trial to estimate the efficacy of a second dose of BCG at school age. The population consisted of children aged 7 to 15 years attending one state school in the urban area of Salvador (Bahia, Brazil), that was selected for BCG re-vaccination in 1996. Parents and children were reserved the right to refuse children participation in the study, both on day zero and eight weeks post-BCG re-vaccination, when blood samples were collected for analysis. All consenting children with previous BCG vaccination assumed by the presence of one suggestive BCG scar on day zero were evaluated. Personal data from all participant children were recorded from the school's registry using a standardized form. All children were apparently healthy at both sample collection points.

On day zero, children were submitted to digital puncture for blood collection, performed after local disinfection with 70% ethanol, using a disposable sterile lancet (Inlab, Sao Paulo, Brazil). This procedure yielded approximately 50 µl of blood, which was collected in a heparinized capillary tube for micro-hematocrite (75 x 1 mm, Perfecta Ind. Com. de Laminas de Vidro LTDA, Sao Paulo, Brazil). Then, the tuberculin test was performed by intradermal injection of 0.1 ml (2 TU) of purified protein derivative (PPD RT 23, Statens Serum Institut, Denmark) on the volar surface of the right arm, with 27G sterile needles. Finally, children were given BCG re-vaccination (Moreau strain, Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil). Forty-eight hours after intradermal injection, the transverse diameters of the indurations were measured using the palpation method. PPD reactivity was read independently by two qualified nurses trained according to the procedures from the Tuberculosis Control Program of the Brazilian Ministry of Health. In the context of the trial, double reading was performed in a sub-sample of 144 children, with high agreement

(kappa=0.96, $P < 0.001$; Pereira S. M., personal communication). Children with PPD readings below 5 mm were considered non-reactors; children with PPD readings ranging from 5 to 9 mm were considered weak reactors and those with PPD readings of 10 mm or above were classified as strong reactors.

Eight weeks after BCG re-vaccination the children were re-submitted to digital puncture blood collection and tuberculin test, by the same team, following the procedures above described.

Whole blood cultures. Blood samples were diluted 1:10 in RPMI medium (GibcoBRL, Rockville, MD) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (GibcoBRL). Two hundred microliters of diluted blood sample were added to each of two wells of a flat-bottom 96 well plate (Corning, NY). One well was stimulated with *M. tuberculosis* H37Rv culture supernatant filtrate (*M. tuberculosis* CSF, 10 µg/ml) and one was left untreated. Plates were incubated in humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂) for 3 days, after which culture supernatants were recovered and kept at -20°C until analysis. The method of whole blood culture for cytokine evaluation has been explored in detail [21].

Cytokine detection in culture supernatants. IFN-γ and TNF-α levels in the supernatants from whole blood cultures performed on day zero and eight weeks after BCG re-vaccination were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using Duo-Set (Genzyme, Cambridge, MA) [22]. IL-10 levels were measured using the kit Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cytokine evaluation sensitivity in our experiments was 15.6 pg/ml for IFN-γ and TNF-α, and 15 pg/ml for IL-10 [23]. Mean IFN-γ levels for non-stimulated wells

were not significantly different from the detection limit ($p > 0.05$, Wilcoxon signed rank test). Mean TNF- α levels for non-stimulated wells reached 192.1 pg/ml (standard deviation, 250.7 pg/ml). TNF- α levels above detection limit for non-stimulated samples are in agreement with previous reports for whole-blood cultures performed with blood collected by finger-stab [24]. IL-10 levels were not measured in these samples. All results mentioned in this report refer to cytokine levels in *M. tuberculosis* CSF-stimulated wells.

Data analyses. Analyses were performed using Corel Quattro Pro (Corel Co. And Corel Co. LTD, Ontario, Canada) and GraphPad Prism v 3.00 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

Comparisons between age groups and low IFN- γ versus high IFN- γ groups were done using the Mann Whitney test. Comparisons between pre-BCG re-vaccination versus post-BCG re-vaccination values were done using the Wilcoxon signed rank test. Tuberculin skin test non-converters, weak converters and strong converters groups were compared using the Kruskal-Wallis test. Spearman's correlation coefficients were calculated to assess degree of association between the parameters studied.

RESULTS

BCG-vaccinated population

Among the consenting children, enrolled in the same public school in the urban area of Salvador (Bahia, Brazil), thirteen did not present scar suggestive of previous BCG vaccination and one had incomplete registry, being excluded from our analysis. One hundred thirty-six children with tuberculin skin test and blood collection on day zero and eight weeks post-BCG re-vaccination were evaluated in this study. The children evaluated were 7 to 15 years old, 57 being boys, and 79 girls (Table 1). No significant differences were found when comparing sexes for the parameters here evaluated, except for TNF- α levels in post-BCG re-vaccination cultures. Surprisingly, girls responded with significantly higher post-BCG re-vaccination TNF- α production than boys (median of 308.9 [0.0 - 1102.0] against 211.3 [0.0 - 838.2] for boys, $p=0.007$, Mann Whitney test).

Immunological evaluations prior to BCG re-vaccination

In pre-BCG re-vaccination whole blood cultures, IFN- γ levels correlated negatively with children age ($p=0.02$, Spearman $r = -0.21$). Cultures from children with age below median responded more frequently to antigen challenge in terms of IFN- γ production than cultures from older children ($p=0.02$, Fig. 1). In cultures with IFN- γ levels above the median (52.9 pg/ml, Table 1), the production of this cytokine has correlated positively with TNF- α levels, as shown in Fig. 2 ($p=0.003$, Spearman $r = 0.28$).

However, most children did not respond to the tuberculin test prior to BCG re-vaccination (Table 1). Nine children were weak reactors (with PPD reaction diameter between 5 and 9 mm), and only one child was a strong reactor (with PPD reaction diameter of 10 mm). We

found a weak correlation between tuberculin reactivity and TNF- α production prior to re-vaccination ($p=0.02$, Spearman $r = 0.19$). No other cytokine evaluated in this study correlated with skin reactivity against tuberculin ($p>0.05$, Spearman correlation analyses). There was no statistically significant difference between tuberculin reactive and tuberculin non-reactive children in terms of age or the production of IFN- γ or TNF- α upon *in vitro* stimulation with *M. tuberculosis* CSF ($p>0.05$, Mann Whitney test).

Immunological evaluations post-BCG re-vaccination

Eight weeks after BCG re-vaccination, 78% of tuberculin non-reactive children converted to a positive PPD test (Table 2). Children classified as PPD non-reactors prior to BCG re-vaccination (Table 1) were subdivided in three categories: children that remained non-reactors after vaccination (non-converters), children that changed to a skin test response diameter between 5 and 9 mm (weak converters) and children that converted to a skin test response diameter of 10 mm or higher (strong converters). There was no difference in post-vaccination IFN- γ , TNF- α or IL-10 *in vitro* production among non-converters, weak converters or strong converters ($p>0.05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA). No correlations were found between PPD reactivity and *in vitro* cytokine responses at eight weeks after BCG re-vaccination ($p>0.05$, Spearman correlation analysis).

Given the central role that IFN- γ plays in the immune response against mycobacterial infection, we have subdivided the evaluated children in two groups, according to their *in vitro* capacity of producing this cytokine in response to stimulation with *M. tuberculosis* CSF prior to re-vaccination. This strategy was used to verify whether BCG re-vaccination had improved the IFN- γ response to *in vitro* challenge with *M. tuberculosis* CSF antigen, and for which group re-vaccination had been most beneficial. The " low IFN- γ " group was composed of children with pre-BCG re-vaccination IFN- γ levels below the population median (52.9 pg/ml,

Table 1), and the “ hi IFN- γ ” group consisted of children with IFN- γ levels above this *median*.

After BCG re-vaccination, 72% (45 out of 62) children classified in the low IFN- γ group presented increased IFN- γ production upon *in vitro* challenge with *M. tuberculosis* CSF, leading to a significant improvement in IFN- γ response (Fig 3A). Median IFN- γ production before re-vaccination increased from near detection limit (12.2 pg/ml) to 46.2 pg/ml post-BCG revaccination levels ($p < 0.0001$, Wilcoxon signed rank test). In contrast, only 35% of the children classified in the hi IFN- γ group (21 out of 60) have presented increased *in vitro* responsiveness to *M. tuberculosis* CSF after BCG re-vaccination. The remaining have either maintained similar or decreased capacity of producing IFN- γ upon *in vitro* stimulation ($p > 0.05$, Wilcoxon signed rank test, Fig 3B). The observed increase in IFN- γ *in vitro* levels by previously unresponsive children was not associated with TNF- α or IL-10 production. Post-BCG re-vaccination IFN- γ response did not correlate with TNF- α production; neither for the whole population studied, nor considering low IFN- γ versus hi IFN- γ groups separately ($p > 0.05$, Spearman correlation analysis). On the other hand, there was no significant difference between low IFN- γ versus hi IFN- γ children when comparing post-BCG re-vaccination IL-10 levels ($p > 0.05$, Mann Whitney test, Fig 3C). On the other hand, TNF- α levels presented a significant positive correlation with IL-10 levels in post-BCG re-vaccination cultures ($p = 0.003$, Spearman $r = 0.53$; Fig. 4). TNF- α levels have diminished in post-BCG re-vaccination cultures from 65% (78 out of 120) children evaluated. Median TNF- α production decreased from 335.5 pg/ml before re-vaccination to 264.6 pg/ml post-BCG revaccination levels ($p = 0.002$, Wilcoxon signed rank test, Tables 1 and 2). As mentioned above, girls responded with significantly higher post-BCG re-vaccination TNF- α production

than boys; therefore the observed decrease in TNF- α responsiveness may have been more accentuated in boys than in girls.

DISCUSSION

Tuberculosis has been considered a global epidemic, and major efforts have been drawn to the design of new vaccines that may consistently induce protection against TB worldwide [25,26]. The evaluation of vaccine protection is complicated by the lack of animal models that accurately mimic human TB, and by the lengthy, low rate development of disease [12]. In the present work, we suggest that the study of the immune response boosting in BCG re-vaccinated populations can be applied to establish potential surrogate markers of protection for pre-selection of TB candidate vaccines.

Increased IFN- γ production upon *in vitro* challenge with mycobacterial antigen is presently considered one putative "gold-standard" for the evaluation of protective immunity in TB infection [12]. We show that detectable pre-BCG re-vaccination IFN- γ levels above threshold were found in whole blood cultures from approximately 70% of the children evaluated, and were more common in cultures from children with age below the median (11 years). IFN- γ and TNF- α *in vitro* levels presented a positive correlation, what may indicate the capacity of mounting a Th1-type response against mycobacteria in these individuals. These findings suggest a possible protective effect of BCG prime vaccination in Brazil, for children 7 to 15 years old.

PPD reactivity has been correlated with protection [27,28], and is currently regarded both as a marker for correct BCG vaccination [29] as well as to diagnose TB infection [30]. PPD reactivity induced by BCG vaccination/re-vaccination is regarded as a confounding factor in

early TB detection [31]. On the other hand, studies evaluating PPD reactivity in BCG vaccinated children suggest that only tuberculin skin reaction diameters above 16 mm should be considered indicative of TB infection in vaccinated populations [32]. In our study population, only one child presented a skin test reaction diameter higher than 10mm, and nine PPD reactive children had tuberculin reactions between 5 and 10 mm. We suggest therefore that the immune responses assessed in our study population may reflect a residual immune response elicited by earlier BCG vaccination, rather than the result of a latent TB infection. Accordingly with this view, in our study PPD reactivity did not correlate with *in vitro* IFN- γ responsiveness, contrary to the findings from previous studies with non-BCG vaccinated individuals in Malawi [33] and with BCG-vaccinated volunteers in Sweden [34]. In both studies a combination of strong tuberculin sensitization and high levels of IFN- γ *in vitro* production upon stimulation with *M. tuberculosis* antigens was associated either with latent infection or the exposure to environmental mycobacteria.

Previous studies have documented the decline of PPD response with age in BCG vaccinated populations, and associated this phenomenon with a concurrent decline of specific immunity conferred by BCG vaccination [35,36]. We have demonstrated a persistent IFN- γ response in the lack of PPD reactivity, especially in children 7 to 10 years old. Moreover, given that more than half of the children evaluated presented an IFN- γ responsiveness above threshold, the decline of the efficacy of BCG with age may be less abrupt than the estimates reported based on PPD responsiveness. These results are also in agreement with the notion that PPD reaction induced after BCG vaccination may not be indicative of the degree of protection against TB [37]. We observed however a high variability of the IFN- γ responsiveness among the children evaluated, even in the group of children between 7 and 10 years of age. In spite of being mandatory in Brazil since the late 70's, BCG vaccination coverage estimates for children under 1 year of age in the study area were inferior to 80% before 1990 [38]. Given those

estimates, we cannot rule out that some of the children that presented high *in vitro* IFN- γ responsiveness prior to BCG re-vaccination may have been vaccinated later in life.

After BCG re-vaccination, most of the children have converted to a positive tuberculin skin test, but no correlations were found between tuberculin reaction diameter or skin test conversion and cytokine production upon *in vitro* antigen challenge post-BCG re-vaccination. We cannot rule out that tuberculin sensitization at the first evaluation may have contributed significantly for the observed increase in skin test responsiveness eight weeks post-BCG re-vaccination, as previously shown [39].

BCG re-vaccination was able to increase IFN- γ production in whole blood cultures of children with low IFN- γ *in vitro* levels prior to BCG re-vaccination. A decrease in the TNF- α response to mycobacterial antigens was also demonstrated for all children evaluated. Diminished TNF- α production was shown to have a beneficial effect in the control of TB infection [40,41] and may be particularly important to prevent severe pulmonary disease [42]. Cheng and co-workers have failed to demonstrate differences in IFN- γ and TNF- α *in vitro* activity eight weeks post-BCG vaccination between individuals from populations with distinct estimates of protection against TB [14]. This could be due to the small number of individuals assayed in this study. In our study, the differences found pre- and post-BCG re-vaccination may have been influenced by a booster effect of re-vaccination. BCG re-vaccination has been shown to improve the protection against leprosy [43], and a recent report demonstrated increased *in vitro* IFN- γ response to *M. leprae* crude antigen associated with lower TNF/IL-10 ratio in exposed leprosy contacts without disease upon BCG re-vaccination [44]. In our study it was not possible to evaluate the changes in IL-10 production upon BCG re-vaccination of the participant children. However, we have found a positive correlation between post-BCG re-

vaccination TNF- α levels and IL-10 production, which would be in agreement with a possible role for IL-10 in the modulation of TNF- α response [45].

BCG vaccinated individuals have been shown to mount an efficient *in vitro* response to challenge with viable bacilli or mycobacterial antigens [46-48]. Even studies with vaccinated individuals from areas where BCG has apparent null efficacy against TB demonstrate a Th1-type immune response with strong cytotoxic activity against the bacilli *in vitro* [14].

Apparently, in such populations BCG cannot boost protection further than that conferred by previous exposure to environmental mycobacteria, as seen in animal models [49,50]. On the other hand, current estimates of BCG protection against mycobacterial disease have been criticized for not taking into account the decrease in disease severity upon BCG re-vaccination [51], which may undervalue its importance in TB control. The design of a better vaccine against TB may actually imply the improvement or overpowering of the observed effects of BCG on the immune response to mycobacterial antigens. In this context, we show that repeated BCG vaccination of Brazilian school-age children induces an *in vitro* response in agreement with present models of protective immunity against mycobacterial diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Johan Van Weyenbergh and Dr. Ana L. Bierrenbach for helpful comments, and to Mr. Jorge Tolentino and the nurse team for technical help.

REFERENCES AND NOTES

- 1 Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S. *et al.* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994, 271(9), 698-702.
- 2 Fine, P.E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995, 346(8986), 1339-45.
- 3 Brewer, T.F. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 2000, 31 Suppl 3, S64-7.
- 4 Eskild, A. [Mass vaccination against tuberculosis--is it necessary in Norway?]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1994, 114(16), 1840-4.
- 5 Kelly, P., McKeown, D. & Clancy, L. Neonatal BCG vaccination in Ireland: evidence of its efficacy in the prevention of childhood tuberculosis. *Eur Respir J* 1997, 10(3), 619-23.
- 6 Bryder, L. 'We shall not find salvation in inoculation': BCG vaccination in Scandinavia, Britain and the USA, 1921-1960. *Soc Sci Med* 1999, 49(9), 1157-67.
- 7 Ginsberg, A.M. & Jacobs, G.G. Tuberculosis vaccines: how close to human testing? National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Cleveland, 1997. 22.
- 8 Blueprint for tuberculosis vaccine development. in *Blueprint for TB vaccine development workshop* (ed. Bloom, B.), Rockville, MD, 1998. 19.
- 9 Orme, I.M. New vaccines against tuberculosis. The status of current research. *Infect Dis Clin North Am* 1999, 13(1), 169-85, vii-viii.

- 10 Orme, I.M. The search for new vaccines against tuberculosis. *J Leukoc Biol* 2001, 70(1), 1-10.
- 11 Wiegeshaus, E.H. & Smith, D.W. Evaluation of the protective potency of new tuberculosis vaccines. *Rev Infect Dis* 1989, 11 Suppl 2, S484-90.
- 12 Ellner, J.J., Hirsch, C.S. & Whalen, C.C. Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Infect Dis* 2000, 30 Suppl 3, S279-82.
- 13 Turner, J., Corrah, T., Sabbally, S., Whittle, H. & Dockrell, H.M. A longitudinal study of in vitro IFN-gamma production and cytotoxic T cell responses of tuberculosis patients in The Gambia. *Tuber Lung Dis* 2000, 80(3), 161-9.
- 14 Cheng, S.H., Walker, K.B., Lowrie, D.B. *et al.* Monocyte antimycobacterial activity before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in Chingleput, India, and London, United Kingdom. *Infect Immun* 1993, 61(10), 4501-3.
- 15 Lugosi, L. Trends in childhood tuberculosis in Hungary 1953-1983: quantitative methods for evaluation of BCG policy. *Int J Epidemiol* 1985, 14(2), 304-12.
- 16 Lugosi, L. BCG policy and tuberculosis control in Hungary. *Dev Biol Stand* 1986, 58(Pt A), 15-21.
- 17 Soares, B.S., Macedo, E.A., Cunha, I.H. & Gomes, A.A. Segundo informe tecnico sobre a vacinacao/revacinacao BCG. Coordenacao Nacional de Pneumologia Sanitaria - CENEPI/FNS/MS, Brasilia, 1994. 56.
- 18 Camargos, P.A., Guimaraes, M.D. & Antunes, C.M. Risk assessment for acquiring meningitis tuberculosis among children not vaccinated with BCG: a case-control study. *Int J Epidemiol* 1988, 17(1), 193-7.

- 19 Wunsch Filho, V., de Castilho, E.A., Rodrigues, L.C. & Huttly, S.R. Effectiveness of BCG vaccination against tuberculous meningitis: a case-control study in Sao Paulo, Brazil. *Bull World Health Organ* 1990, 68(1), 69-74.
- 20 Penna, G.O., Teixeira, M.G. & Pereira, S.M. Doencas de Interesse para a saude publica: tuberculose. In *Doencas Infecciosas e Parasitarias: aspectos clinicos, vigilancia epidemiologica e medidas de controle* Centro Nacional de Epidemiologia - CENEPI/FUNASA/MS, Brasilia, 2000. 197-200.
- 21 van Crevel, R., van der Ven-Jongekrijg, J., Netea, M.G., de Lange, W., Kullberg, B.-J. & van der Meer, J.W.M. Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis. *J Immunol Methods* 1999, 222, 145-53.
- 22 From 136 pre-BCG re-vaccination cultures, 134 were evaluated for TNF-a levels, and 122 were evaluated for IFN-g levels. One hundred thirty-one cultures from post-BCG re-vaccination whole blood samples were evaluated for both IFN-g and TNF-a, and one was evaluated only for IFN-g. Due to technical difficulties, we were only able to assess IL-10 production in 42 post-BCG revaccination whole blood cultures.
- 23 In every ELISA plate evaluated, four wells with the supernatant of whole blood culture stimulated with concanavalin A (Sigma, Saint Louis, MO) were used as an internal positive control. IFN-g mean production levels in concanavalin A positive control wells attained 724.8 pg/ml (standard deviation, 67.54 pg/ml) in pre-BCG re-vaccination evaluations; and 757.2 pg/ml (standard deviation, 34.03 pg/ml) in post-BCG re-vaccination measurements.

- 24 McNamee, J.P., Bellier, P.V. & McLean, J.R.N. Differential rates of cytokine production and apoptosis in venipuncture and finger-stab derived blood cultures. *Cytokine* 2001, 15(5), 274-80.
- 25 Breiman, R.F. & Ginsberg, A.M. An overview of the proceedings of the International Symposium on Tuberculosis Vaccine Development and Evaluation: recognizing and addressing the barriers. *Clin Infect Dis* 2000, 30(Suppl 3), S199-200.
- 26 Grange, J.M. Effective vaccination against tuberculosis - a new ray of hope. *Clin Exp Immunol* 2000, 120, 232-4.
- 27 Stanford, J.L., Sheikh, N., Bogle, G., Baker, C., Series, H. & Mayo, P. Protective effect of BCG in Ahmednagar, India. *Tubercle* 1987, 68(3), 169-76.
- 28 al-Kassimi, F.A., Abdullah, A.K., al-Orainey, I.O. *et al.* The significance of positive Mantoux reactions in BCG-vaccinated children. *Tubercle* 1991, 72(2), 101-4.
- 29 Vallishayee, R.S., Anantharaman, D.S. & Gupte, M.D. Tuberculin sensitivity and skin lesions in children after vaccination with two batches of BCG vaccine. *Indian J Lepr* 1998, 70(3), 277-86.
- 30 Barnes, P.F. Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163, 807-8.
- 31 Cohn, D.L. The effect of BCG vaccination on tuberculin skin testing: does it matter? *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164, 915-6.
- 32 Chee, C.B.E., Soh, C.H., Boudville, I.C., Chor, S.S. & Wang, Y.T. Interpretation of the tuberculin skin test in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated Singaporean schoolchildren. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164, 958-61.

- 33 Black, G.F., Dockrell, H.M., Crampin, A.C. *et al.* Patterns and implications of naturally acquired immune responses to environmental and tuberculous mycobacterial antigens in northern Malawi. *J Infect Dis* 2001, 184(3), 322-9.
- 34 Fjällbrant, H., Ridell, M. & Larsson, L.O. The tuberculin skin test in relation to immunological in vitro reactions in BCG-vaccinated health-care workers. *Eur Respir J* 2001, 18, 376-80.
- 35 Sterne, J.A., Rodrigues, L.C. & Guedes, I.N. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis* 1998, 2(3), 200-7.
- 36 Fine, P.E., Bruce, J., Ponnighaus, J.M., Nkhosa, P., Harawa, A. & Vynnycky, E. Tuberculin sensitivity: conversions and reversions in a rural African population. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, 3(11), 962-75.
- 37 al-Kassimi, F.A., al-Hajjaj, M.S., al-Orainey, I.O. & Bamgboye, E.A. Does the protective effect of neonatal BCG correlate with vaccine-induced tuberculin reaction? *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152(5 Pt 1), 1575-8.
- 38 Anuario Estadístico: Informacoes de Saude - dados por municipio. Centro de Informacoes de Saude - SESAB, Salvador, 1997. 628.
- 39 Menzies, D. Interpretation of repeated tuberculin tests: boosting, conversion and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159, 15-21.
- 40 Moreira, A.L., Tsenova-Berkova, L., Wang, J. *et al.* Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1997, 78(1), 47-55.

- 41 Bekker, L.G., Moreira, A.L., Bergtold, A., Freeman, S., Ryffel, B. & Kaplan, G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun* 2000, 68(12), 6954-61.
- 42 Bekker, L.G., Maartens, G., Steyn, L. & Kaplan, G. Selective increase in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis* 1998, 178(2), 580-4.
- 43 Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. Karonga Prevention Trial Group. *Lancet* 1996, 348(9019), 17-24.
- 44 Lima, M.C., Pereira, G.M., Rumjanek, F.D. *et al.* Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* 2000, 51(4), 419-28.
- 45 Moore, K.W., Malefyt, R.W., Coffman, R.L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001, 19, 683-765.
- 46 Ravn, P., Boesen, H., Pedersen, B.K. & Andersen, P. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol* 1997, 158(4), 1949-55.
- 47 Hoft, D.F., Brown, R.M. & Roodman, S.T. Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *J Immunol* 1998, 161(2), 1045-54.
- 48 Marchant, A., Goetghebuer, T., Ota, M.O. *et al.* Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *J Immunol* 1999, 163(4), 2249-55.

- 49 Buddle, B.M., Wards, B.J., Aldwell, F.E., Collins, D.M. & de Lisle, G.W. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002, 20(7-8), 1126-33.
- 50 Brandt, L., Feino Cunha, J., Weinreich Olsen, A. *et al.* Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002, 70(2), 672-8.
- 51 Kulkarni, H.R. & Zodpey, S.P. Differential protective effect of bacillus Calmette-Guerin vaccine against multibacillary and paucibacillary leprosy in Nagpur, India. *Pub Health* 1999, 113, 311-3.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Pre-BCG re-vaccination IFN- γ levels in finger stab-derived whole blood cultures stimulated with *M. tuberculosis* CSF, according with children age. Open squares, levels in cultures from children up to eleven years old; closed squares, levels in cultures from children 12 to 15 years old.

Fig. 2. Correlation between IFN- γ and TNF- α production in pre-BCG re-vaccination finger stab-derived whole blood cultures. Open circles, levels in cultures from children with IFN- γ production below the median (52,9 pg/ml)-"low IFN- γ ". Closed circles, levels in cultures from children with IFN- γ production above the median -"hi IFN- γ ".

Fig. 3. Evolution of cytokine levels in finger stab-derived whole blood cultures from pre-BCG re-vaccination hi versus low IFN- γ producers. A, Pre-BCG re-vaccination versus post-BCG re-vaccination IFN- γ levels in IFN- γ low producers prior to BCG re-vaccination. B, Pre-BCG re-vaccination versus post-BCG re-vaccination IFN- γ levels in IFN- γ hi producers prior to BCG re-vaccination. C, Post-BCG re-vaccination IL-10 levels in pre-BCG re-vaccination hi versus low IFN- γ producers.

Fig. 4. Correlation between TNF- α and IL-10 levels in finger stab-derived whole blood cultures post-BCG re-vaccination.

FIG. 1

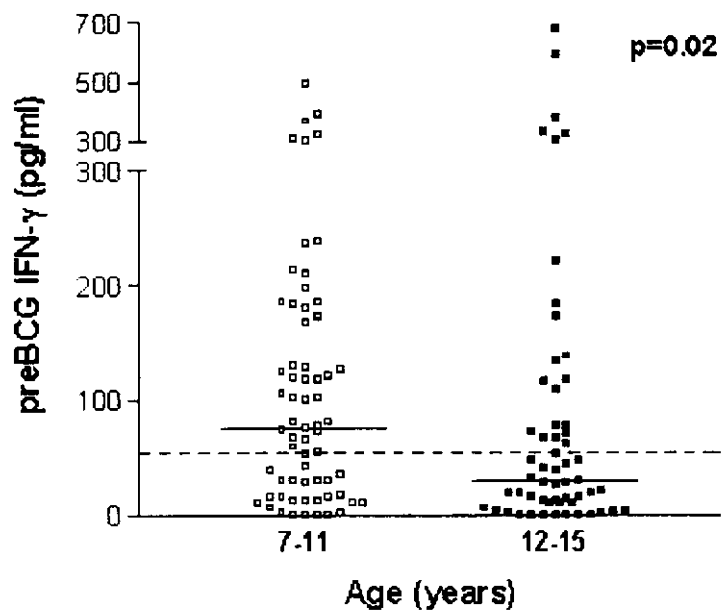


FIG. 2

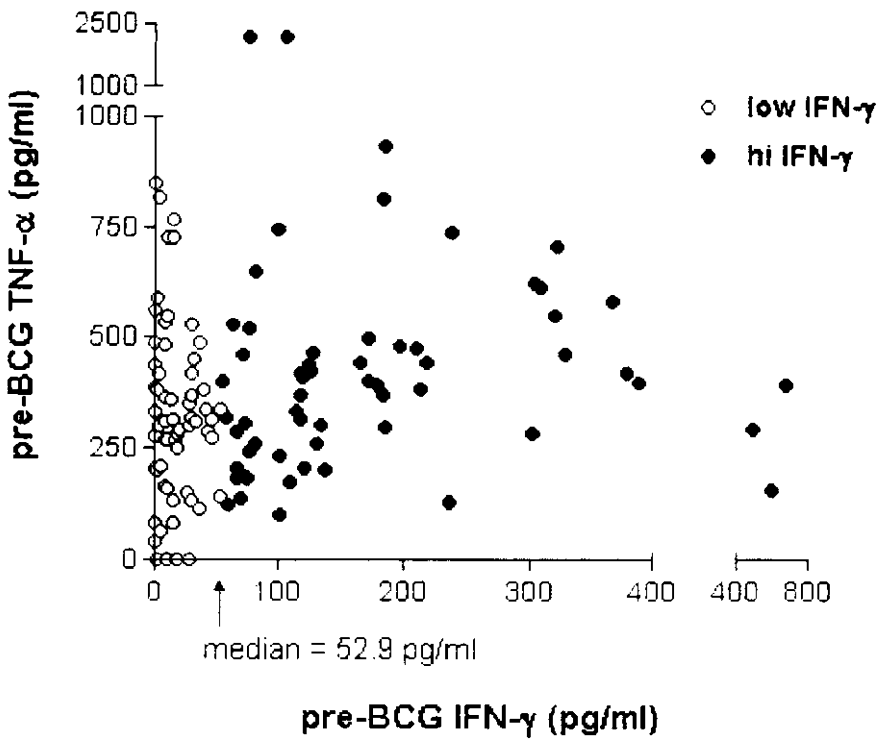


FIG. 3

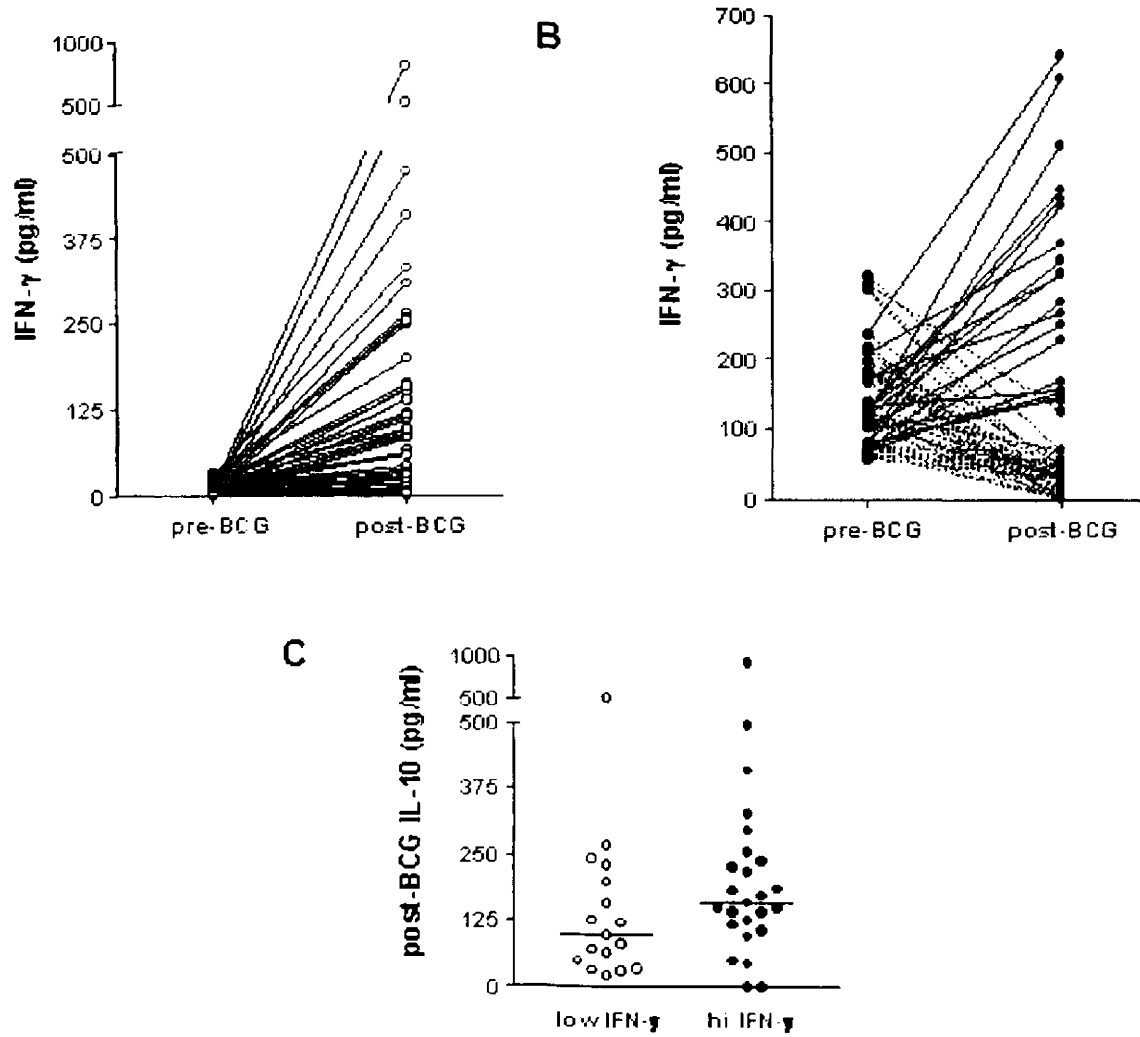


FIG. 4

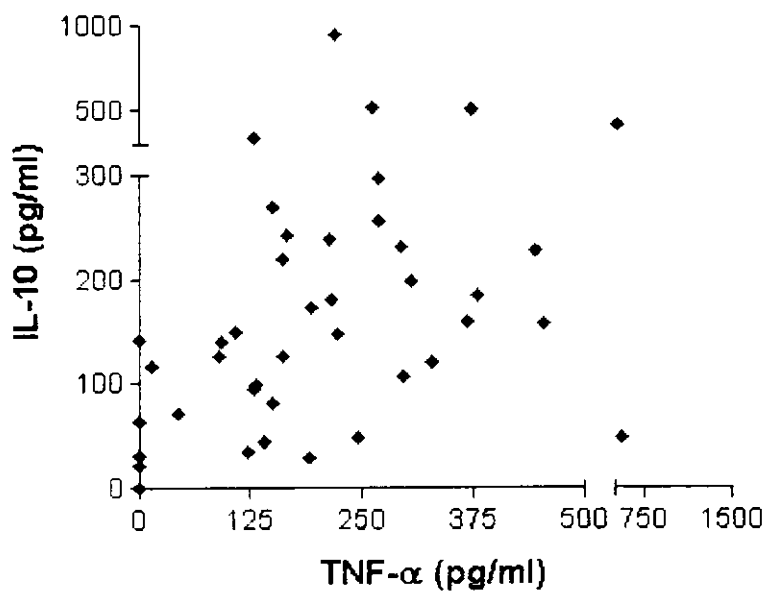


Table 1. Population and immunological parameters in school-age children before BCG re-vaccination.

	n ¹	PPD (mm) ²	Age (years)	Sex ratio (M:F) ¹	IFN- γ (pg/ml) ²	TNF- α (pg/ml) ²
Non-reactors (PPD < 5mm)	126	0	11 [7-15]	52:74	47 [0-678]	327 [0-2169]
PPD reactors (PPD \geq 5mm)	10	7.5	10 [7-13]	5:5	91 [0-389]	384 [64-2184]
Total	136	0	11 [7-15]	57:79	53 [0-678]	336 [0-2184]

¹Number of children classified in the group. ²Median [min-max].

Table 2. Population and immunological parameters in school-age children 60 days after BCG re-vaccination.

	n ²	PPD (mm) ³	Age (years)	Sex ratio (M:F)	IFN- γ (pg/ml) ³	TNF- α (pg/ml) ³	IL-10 (pg/ml) ³
Pre-vaccination PPD reactors ¹	10	13 [2-15]	10 [7-13]	5:5	46 [0-553]	276 [0-557]	125 [107-410]
Non-converters (PPD < 5mm)	28	2 [0-4]	12 [7-14]	16:12	51 [0-608]	219 [0-838]	140 [30-947]
Weak converters (5 \leq PPD < 10mm)	52	7 [5-9]	12 [8-15]	17:35	58 [0-642]	297 [0-1022]	157 [0-516]
Strong converters (PPD \geq 10mm)	46	12 [10-17]	11 [7-14]	19:27	45 [0-793]	238 [0-909]	148 [0-497]
Total	136	8 [0-17]	11 [7-15]	57:79	54 [0-793]	265 [0-1022]	144 [0-947]

¹ Pre-vaccination PPD \geq 5 mm. (See Table 1). ² Number of children classified in the group. ³ Median [min-max].

3 DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós focalizamos o estudo dos mediadores solúveis que estão envolvidos na imuno-regulação da resposta anti-micobacteriana, apresentando duas contribuições originais ao conhecimento atual dos mecanismos imunes induzidos em duas situações consideradas como modelos de proteção contra a tuberculose: a regressão espontânea dos sintomas durante a tuberculose pleural e o reforço da imunização de crianças saudáveis em idade escolar (de 7 a 15 anos) por aplicação de uma segunda dose de vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Os dados aqui revisados e analisados sugerem que a imuno-regulação da reação inflamatória granulomatosa na fase de resolução da doença, com a possível participação da produção de IL-10, pode ser fundamental na resposta protetora contra o bacilo, e reforçam a utilidade e aplicabilidade do estudo da modulação das citocinas envolvidas nesta resposta, em particular o IFN- γ , o TNF- α e a IL-10, como marcadores imunológicos de proteção contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Nós observamos uma correlação significativa entre os níveis das citocinas do tipo Th1 (IFN- γ , IL-12 e TNF- α) no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa, bem como entre estas citocinas e os níveis de receptor solúvel de IL-2 (sIL-2R), indicando uma correspondência entre a presença destes mediadores e a ativação linfocitária *in vivo* no sítio da infecção (Manuscrito I). A correlação entre os níveis de citocinas Th1 reproduziu-se nas culturas de células do sangue periférico de escolares antes da revacinação com BCG, estimuladas com antígeno de *M. tuberculosis* (Manuscrito II). Este fato está de acordo com o desenvolvimento de uma resposta imune celular, considerada protetora contra infecções

intracelulares (MURRAY, 1999), em ambos os modelos estudados de proteção contra a tuberculose humana.

A prevenção da reativação do foco primário após a primo-infecção com o *M. tuberculosis* provavelmente requer uma modulação da resposta anti-micobacteriana no sentido de evitar tanto a expansão das micobactérias, através da produção de citocinas indutoras da resposta celular, bem como o dano tecidual, através da indução de citocinas anti-inflamatórias e da cicatrização. O dano tecidual envolvido na resposta imune contra o *M. tuberculosis* consiste na indução da apoptose de células infectadas (KEANE *et al*, 1997) e na lise de células adjacentes (ORME, 1998), como consequência da resposta imune montada contra o bacilo. Estudos mostram que em granulomas com necrose central há multiplicação das micobactérias, e a evolução da necrose no centro dos granulomas leva à liquefação do tecido (caseação), com o consequente carreamento do bacilo para outros sítios pulmonares. O processo de caseação também dá origem às "cavernas pulmonares", áreas de destruição do tecido pulmonar presentes nos indivíduos com tuberculose pulmonar grave (BROLIO & de LIMA-FILHO, 1982). Apesar de não ser o único fator envolvido na necrose em resposta à infecção tuberculosa (BEAN *et al*, 1999; EHLERS *et al*, 1999; EHLERS *et al*, 2000), foi demonstrado no modelo murino que o TNF- α pode potencializar a necrose (BEKKER *et al*, 2000), e que a sua neutralização após a formação dos granulomas não induz aumento da bacteremia mas diminui o dano tecidual observado no pulmão de camundongos infectados com o *M. tuberculosis* (MOREIRA *et al*, 1997). Em concordância com estes resultados, nós demonstramos que o TNF- α apresenta correlação significativa com a extensão da necrose em granulomas pleurais (Manuscrito I). Neste contexto, é interessante notar que ao comparar o lavado broncoalveolar de indivíduos sadios com resposta ao teste tuberculínico acima de 10 mm de diâmetro (PPD positivos) com o de pacientes com tuberculose pulmonar, a detecção direta do TNF α é sempre possível nos pacientes com tuberculose pulmonar estudados.

contrastando com pelo menos 50% de lavados negativos para esta citocina entre os indivíduos saudáveis (SCHWANDER *et al*, 1998). Também o estudo da produção de citocinas em resposta a lipopolissacarídeo (LPS) ou muramil di-peptídeo por monócitos do sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar, em comparação com voluntários saudáveis PPD positivos, mostra maior capacidade de produção de TNF- α e IL-6 nas culturas de pacientes com tuberculose pulmonar (OGAWA *et al*, 1991).

A diminuição dos níveis de TNF- α foi encontrada associada à melhora dos sintomas em estudos clínicos da resolução da tuberculose durante o tratamento com tuberculostáticos (CONDOS *et al*, 1998), e o seu aumento foi relacionado ao agravamento do quadro clínico no início do tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar severa (BEKKER *et al*, 1998). Alguns autores sugerem inclusive que o rápido declínio dos níveis de TNF- α após o início do tratamento com drogas anti-micobacterianas seria indicativo de um bom prognóstico da doença tuberculosa associada à AIDS (HSIEH *et al*, 1999). Nós verificamos que após a revacinação com BCG existe uma queda dos níveis de TNF- α produzidos por estimulação *in vitro* com antígeno de *M. tuberculosis*, embora haja aumento da produção de IFN- γ nas mesmas culturas (Manuscrito II). Dados do nosso laboratório mostram que em pacientes com tuberculose pulmonar classificados quanto à gravidade da doença segundo os critérios da American Thoracic Society (ATS), as culturas de sangue total estimuladas com antígeno de *M. tuberculosis* H37Rv ou PPD não diferem na produção de IL-10 ou de IFN- γ entre os pacientes com a forma mínima e os com a forma moderada da doença, mas os níveis de TNF- α tendem a estar aumentados nas culturas dos pacientes com as formas moderada e avançada (FERREIRA, 1999). Em nossos pacientes com tuberculose pleural, os níveis de IFN- γ e TNF- α estavam mais baixos nos indivíduos em regressão espontânea dos sintomas, em comparação com aqueles na fase inicial da pleurite tuberculosa (Manuscrito I). Com base nestes

resultados, nós sugerimos que a modulação negativa da resposta Th1, em especial dos níveis de TNF- α , pode fazer parte da resposta imune protetora contra o *M. tuberculosis*.

A resposta imune celular, que envolve a produção de citocinas como o IFN- γ e o TNF- α , pode ser inibida ou modulada negativamente pela ação de citocinas anti-inflamatórias, como o TGF- β e a IL-10, ou pela ação de citocinas antagonistas, envolvidas na resposta imune humoral (do tipo Th2), como a IL-4 e a IL-13 (PAUL, 1998). A avaliação direta dos níveis de citocinas no lavado broncoalveolar de pacientes com tuberculose pulmonar (SCHWANDER *et al*, 1998) ou no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa ((BARNES *et al*, 1993), Manuscrito I) não revela a presença de citocinas envolvidas na resposta Th2, nomeadamente a IL-4 e a IL-5. No entanto, a avaliação da produção de citocinas a nível de cada célula, por estimulação *in vitro* com antígenos micobacterianos e revelação da produção de citocinas por ELISPOT (SURCEL *et al*, 1994), ou por ativação policlonal e imuno-marcação por citometria de fluxo (van CREVEL *et al*, 2000), bem como a avaliação da presença de RNA mensageiro (ZHANG *et al*, 1995; BERGERON *et al*, 1997), demonstram a existência de células capazes de produzir IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 no sangue periférico e/ou no linfonodo de drenagem em pacientes com tuberculose.

A presença de citocinas inibitórias da resposta Th1 e/ou suas células produtoras no sítio da infecção tuberculosa ou no sangue periférico de pacientes com diversas formas de tuberculose foi discutida por alguns autores como possivelmente envolvida na indução de maior gravidade da doença. Outros trabalhos na literatura sugerem no entanto que enquanto a resposta imune em formas graves de tuberculose pode estar associada a um padrão Th0/Th2 de resposta, a detecção da produção de citocinas como a IL-4 ou a IL-10 não é por si só indicativa de uma resposta ineficaz contra o *M. tuberculosis* (revisto em 1.4.3). É possível que outros mediadores produzidos em resposta ao bacilo influenciem no papel específico destas

citocinas deativadoras no sítio da infecção tuberculosa. Em concordância com esta sugestão, Rojas e colaboradores (ROJAS *et al*, 1999) mostram que, enquanto a adição de IL-10 a culturas de sangue periférico de doadores saudáveis PPD positivos diminuiu o número de células T CD4⁺ e $\gamma\delta$ ⁺ expressando em sua superfície a cadeia alfa do receptor para a IL-2 (CD25), indicativa de ativação celular, a adição concomitante de IL-2 restaura a percentagem de células CD25⁺ aos níveis encontrados sem adição de IL-10.

Por outro lado, alguns trabalhos sugerem um possível papel de citocinas inibitórias da resposta Th1, como a IL-4 ou a IL-10, na contenção da infecção pelo *M. tuberculosis*. A participação da IL-4 durante a resposta granulomatosa foi sugerida com base na avaliação da infecção experimental de camundongos deficientes de IL-4, que mostra o desenvolvimento de granulomas maiores e maior crescimento das micobactérias no pulmão apesar de uma resposta normal de IFN- γ , TNF- α e produção de óxido nítrico (SUGAWARA *et al*, 2000). A comparação da resposta imune de camundongos normais com camundongos deficientes de IL-10 demonstra que em camundongos normais ocorrem transitoriamente níveis mais baixos de IFN- γ no início da infecção, o que não se reflete em menor sobrevivência em relação aos camundongos deficientes de IL-10. No entanto, a produção de mediadores da resposta inflamatória pelos macrófagos dos camundongos deficientes de IL-10 está aumentada (MURRAY & YOUNG, 1999), sugerindo um papel para a IL-10 na modulação da inflamação crônica durante a doença tuberculosa.

No estudo relatado no Manuscrito I, nós observamos uma correlação positiva entre a extensão da necrose/fibrose nos granulomas pleurais e os níveis de TNF- α e IL-10 presentes no líquido pleural dos pacientes com pleurite tuberculosa. Os níveis de IL-10 também mostraram correlação bastante significativa com os níveis de IFN- γ e TNF- α , indicando um possível papel desta citocina na modulação negativa da resposta Th1 observada em pacientes

na fase regressiva da doença. Também nas culturas de sangue periférico de escolares re-vacinados com BCG os níveis de IL-10 apresentaram correlação bastante significativa com os níveis de TNF- α (Manuscrito II). Estes dados estão de acordo com uma possível participação da IL-10 na modulação da resposta Th1 contra a micobactéria, e portanto com um possível papel protetor da produção de IL-10 na moderação do dano tecidual causado durante a resposta contra o *M. tuberculosis*.

Respostas auto-agressoras são desencadeadas no contexto de algumas doenças infecciosas, onde o mimetismo antigênico, a ativação de células com potencial auto-reator por citocinas e outros estímulos no sítio de resposta a patógenos ou à microbiota normal, e/ou fatores ambientais e a predisposição genética do hospedeiro promovem a expansão de clones de células auto-reativas que prolongam a inflamação e o dano tissular causado pela resposta específica contra o patógeno. Um exemplo bem estudado é o da Doença de Chagas, em que células específicas contra proteínas do músculo cardíaco estão presentes e participam da imunopatologia da doença, sendo que sua ativação no contexto da resposta contra o *Trypanosoma cruzi* é desencadeada por fatores ainda não completamente esclarecidos (revisto em BENOIST & MATHIS, 2001; ENGMAN & LEON, 2002). Uma resposta auto-agressora deste tipo vem sendo sugerida como mecanismo etiológico da Doença de Crohn, uma doença inflamatória crônica do intestino que tem sido associada à soro-reatividade contra antígenos do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (EL-ZAATARI *et al.* 1999; NASER *et al.* 1999).

Entre os mecanismos envolvidos no controle de respostas auto-agressoras, recentemente vem sendo demonstrado o papel de células T regulatórias na prevenção da expansão e da atividade de clones auto-reativos, principalmente em doenças experimentais órgão-específicas (MASON & POWRIE, 1998). A capacidade regulatória de células T dentro do

compartimento CD4 foi demonstrada em experimentos de indução experimental de doenças auto-imunes e doença inflamatória do intestino por transferência de células T CD4 com fenótipo naïve (CD45RB^{hi}) para camundongos deficientes de linfócitos T e B (RAG2⁰). A indução da resposta auto-agressora deve-se provavelmente à ativação exacerbada das células T CD4⁺CD45RB^{hi}, que produzem grande quantidade de citocinas do tipo Th1 a partir de um evento desencadeador ainda desconhecido, e promovem inflamação crônica no intestino dos animais RAG2⁰ recipientes (ANNACKER *et al*, 2000). As células T CD4⁺ regulatórias fazem parte do compartimento CD45RB^{low} de linfócitos ativados/de memória em animais não manipulados mantidos em condições específicas de ausência de patógenos (SPF). Elas incluiriam células (as quais apresentariam o fenótipo CD25⁻) com capacidade de regular a expansão de células potencialmente auto-reativas, bem como células capazes de prevenir a evolução para doença em experimentos de co-injeção de células com potencial auto-reator (não se excluindo a participação das células CD25⁻ neste último fenômeno). Em ambos os fenômenos a participação da IL-10 foi implicada, já que a transferência de células "potencialmente regulatórias" com os fenótipos acima descritos provenientes de camundongos deficientes de IL-10, juntamente com células naïve com potencial auto-reator, não previne a expansão destas últimas nem o desenvolvimento da doença inflamatória do intestino (ANNACKER *et al*, 2001; em anexo¹). Por outro lado, experimentos com a indução experimental da doença inflamatória do intestino em condições que permitem a infecção por microorganismos (não-SPF) mostram que sob estas condições é mais difícil o controle por parte das células regulatórias do potencial auto-agressor de células naïve co-transferidas (ANNACKER *et al*, 2000). É possível portanto que a infecção por microorganismos favoreça a indução de células auto-agressivas, o que implicaria um papel relevante das células T

¹ Este trabalho foi desenvolvido com participação da autora THEOLIS COSTA BARBOSA, no período de realização das atividades concernentes ao Trabalho de Doutorado que constam da presente Tese, sendo por isso anexado a este volume.

regulatórias no controle de respostas imunes ainda que não dirigidas contra antígenos próprios.

Neste contexto, seria interessante identificar se a correlação TNF- α /IL-10 observada em modelos de infecção pelo *M. tuberculosis* traduz uma regulação exclusivamente da resposta inflamatória do macrófago, ou se parte da resposta observada refletiria a regulação do potencial auto-agressor de células T estimuladas no âmbito da resposta contra antígenos micobacterianos. Tal investigação pode ser de relevância no esclarecimento dos mecanismos que permitem que a maior parte dos indivíduos consiga estabelecer uma relação de contenção da infecção em um foco primário, enquanto que em outros indivíduos, a um tempo determinado, apesar do desenvolvimento de uma resposta do tipo protetor, ocorre caseação e disseminação do bacilo a partir do foco primário, e conseqüentemente doença tuberculosa.

As correlações observadas entre os níveis de mediadores solúveis no líquido pleural e parâmetros clínicos e histopatológicos de evolução/resolução da pleurite tuberculosa nos sugerem que a resposta imune contra o bacilo modifica-se de forma detectável quanto à produção IFN- γ , TNF- α e IL-10 no sítio da infecção (Manuscrito I). Nós mostramos que escolares primo-vacinados de 7 a 15 anos em Salvador (Bahia, Brasil) apresentaram resposta detectável de IFN- γ *in vitro* face a estímulo com antígeno filtrado do sobrenadante de cultura de *M. tuberculosis* H37Rv (Manuscrito II), e que a re-vacinação com BCG foi capaz de aumentar a produção *in vitro* de IFN- γ por uma parte das crianças avaliadas, principalmente por aquelas que apresentavam baixa resposta antes da re-vacinação. Vários estudos sugerem uma correspondência entre a capacidade das células do sangue periférico de produzir IFN- γ por estimulação *in vitro* e a eficácia da resposta imune contra a infecção tuberculosa (SURCEL *et al*, 1994; ZHANG *et al*, 1995; SCHWANDER *et al*, 1998; SWAMINATHAN *et al*, 1999; BOUSSIOTIS *et al*, 2000). Por outro lado, os níveis de TNF- α induzidos por

estimulação *in vitro* nas culturas de sangue periférico diminuíram significativamente após a re-vacinação, e apresentaram correlação positiva com os níveis de IL-10 de forma semelhante à observada no sítio de infecção pleural. A correspondência entre estes dois modelos humanos de proteção contra o *M. tuberculosis* pode indicar que as regulações evidenciadas podem estar implicadas ou servir como marcadores da indução de uma resposta protetora contra o bacilo.

Nossos dados apontam portanto uma possível utilidade do estudo da indução destes mediadores como potenciais correlatos de proteção na tuberculose humana. Nós demonstramos também a aplicabilidade desta abordagem para estudos populacionais de maior escala, utilizando pequenas quantidades de sangue e uma equipe de quatro pessoas para as avaliações laboratoriais, na realização dos testes descritos em mais de trezentas crianças no dia de re-vacinação com BCG, e em mais de cem crianças oito semanas após a re-vacinação.

A resposta imune celular contra o *M. tuberculosis* assume um papel fundamental na eliminação das micobactérias intracelulares e sua regulação pode atuar prevenindo o dano tecidual e a conseqüente disseminação pulmonar do bacilo, com possíveis implicações na evolução da infecção para doença tuberculosa. As conclusões retiradas a partir dos nossos estudos fundamentam-se na interpretação de modelos de resposta imunológica contra o bacilo, e portanto não permitem inferências acerca do papel e/ou capacidade preditiva da indução de citocinas na fase inicial de colonização pulmonar pelo *M. tuberculosis*. Não existem na literatura modelos que explorem isoladamente a prevenção da colonização pelo bacilo e a prevenção do desenvolvimento da doença tuberculosa (MCMURRAY, 2001), pelo que até o presente não há como avaliar este componente da eficácia vacinal. Neste aspecto, o estudo da resposta imune contra moléculas implicadas na infecção macrofágica e o desenvolvimento de técnicas que permitam induzir a resposta imune de mucosa contra tais

moléculas no trato respiratório poderão revelar-se interessantes no desenvolvimento de novas abordagens profiláticas ou terapêuticas contra a tuberculose.

4 CONCLUSÕES

1. Em nosso trabalho, reforçamos a aplicabilidade da avaliação da produção de citocinas *in vitro* por estímulo com antígenos micobacterianos no estudo da eficácia de estratégias vacinais contra a doença tuberculosa.
2. O estudo dos mediadores solúveis no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa em diferentes fases da doença mostra variações significativas dos níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 durante a regressão espontânea dos sintomas, apontando estas citocinas como potenciais marcadores de proteção contra a tuberculose humana.
3. O mesmo estudo sugere a participação da IL-10 na modulação negativa dos níveis de TNF- α e da destruição tecidual no sítio de infecção tuberculosa, indicando um possível papel desta citocina na evolução da infecção para a doença.
4. A avaliação da resposta de crianças em idade escolar contra antígenos de *M. tuberculosis* antes e após a re-vacinação com BCG mostra a potencialização da resposta de memória *in vitro* contra o bacilo, e sugere um possível papel protetor desta vacina contra a tuberculose em nosso meio.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- _____ Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report - Tuberculosis Prevention Trial. *Bull World Health Organ*, 57: 819-827, 1979.
- _____ Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. Karonga Prevention Trial Group. *Lancet*, 348: 17-24, 1996.
- _____ Fifteen year follow up of trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. Tuberculosis Research Centre (ICMR), Chennai. *Indian J Med Res*, 110: 56-69, 1999.
- AINSLIE, G.M.; SOLOMON, J.A. & BATEMAN, E.D. Lymphocyte and lymphocyte subset numbers in blood and in bronchoalveolar lavage and pleural fluid in various forms of human pulmonary tuberculosis at presentation and during recovery. *Thorax*, 47: 513-518, 1993.
- AIT-KHALED, N. & ENARSON, D. *Tuberculose: manuel pour les etudiants en medecine*. 1a ed. Geneve, Suisse: Organizacao Mundial de Saude/Uniao Internacional Contra a Tuberculose e as Doenças Respiratorias, 149p. 1999.
- AL-KASSIMI, F.A.; AL-HAJJAJ, M.S.; AL-ORAINY, I.O. & BAMGBOYE, E.A. Does the protective effect of neonatal BC correlate with vaccine-induced tuberculin reaction? *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 1575-1578, 1995.

- ANNACKER, O.; BURLIN-DEFRANOUX, O.; PIMENTA-ARAUJO, R.; CUMANO, A. & BANDEIRA, A. Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol*, 164: 3573-, 2000.
- ANNACKER, O.; PIMENTA-ARAUJO, R.; BURLIN-DEFRANOUX, O.; BARBOSA, T.C.; CUMANO, A. & BANDEIRA, A. CD25+CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*, 166: 3008-3018, 2001.
- ARRUDA, S.; CHALHOUB, M.; CARDOSO, S. & BARRAL-NETTO, M. Cell-mediated immune responses and cytotoxicity to mycobacterial antigens in patients with tuberculous pleurisy in Brazil. *Acta Tropica*, 71: 1-15, 1998.
- BAILY, G.V.J.; NARAIN, R.; MAYURNATH, S.; VALLISHAYEE, R.S. & GULD, J. Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. Tuberculosis Prevention Trial, Madras. *Ind J Med Res*, 72(suppl): 1-74, 1980.
- BARNES, P.F. Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 807-808, 2001.
- BARNES, F.F.; LU, S.; ABRAMS, J.S.; WANG, E.; YAMAMURA, M. & MODLIN, R.L. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun*, 61: 3482-3489, 1993.
- BEAN, A.G.; ROACH, D.R.; BRISCOE, H.; FRANCE, M.P.; KORNER, H.; SEDGWICK, J.D. & BRITTON, W.J. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol*, 162: 3504-3511, 1999.

- BEKKER, L.G.; MOREIRA, A.L.; BERGTOLD, A.; FREEMAN, S.; RYFFEL, B. & KAPLAN, G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun*, 68: 6954-6961, 2000.
- BEKKER, L.G.; MAARTENS, G.; STEYN, L. & KAPLAN, G. Selective increase in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis*, 178: 580-584, 1998.
- BENOIST, C. & MATHIS, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol*, 2: 797-801, 2001.
- BERGERON, A.; BONAY, M.; KAMBOUCHNER, M.; LECOSSIER, D.; RIQUET, M.; SOLER, P.; HANCE, A. & TAZI, A. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas. *J Immunol*, 159: 3034-3043, 1997.
- BIERRENBACH, A.L.; CUNHA, S.S.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M. & RODRIGUES, L.C. Skin test reactivity to mycobacterial antigens parallels the phylogenetic structure of their genus. *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: 656-663, 2001.
- BISHAI, D.M. & MERCER, D. Modeling the economic benefits of better TB vaccines. *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: 984-993, 2001.
- BLOOM, B.R. & FINE, P.E.M. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Eds) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. 1a ed, American Society for Microbiology, Washington, DC: 13-24, 1994.
- BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M. & HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon gamma. *Annu Rev Immunol*, 15: 749-795, 1997.

- BOUSSIOTIS, V.A.; TSAI, E.Y.; YUNIS, E.J.; THIM, S.; DELGADO, J.C.; DASCHER, C.C.; BEREZOVSKAYA, A.; ROUSSET, D.; REYNES, J.-M. & GODFELD, A.E. IL-10 producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest*, 105: 1317-1325, 2000.
- BROLIO, R. Contribuicao para o estudo das medidas de controle da tuberculose no Brasil, pela vacinacao BCG. *Rev Ass Med Brasil*, 21 1975.
- BROLIO, R. & de LIMA-FILHO, M.T. Tuberculose pulmonar. In: Veronesi, R. (Eds) *Doenças infecciosas e parasitarias*. 7a. ed. Guanabara Koogan S. A, Rio de Janeiro: 314-335, 1982.
- BRYDER, L. 'We shall not find salvation in inoculation': BCG vaccination in Scandinavia, Britain and the USA, 1921-1960. *Soc Sci Med*, 49: 1157-1167, 1999.
- CASARINI, M.; AMEGLIO, F.; ALEMANNI, L.; ZANGRILLI, P.; MATTIA, P.; PAONE, G.; BISETTI, A. & GIOSUE, S. Cytokine levels correlate with a radiologic score in active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 143-148, 1999.
- CAMARGOS, P.A.; GUIMARAES, M.D. & ANTUNES, C.M. Risk assessment for acquiring meningitis tuberculosis among children not vaccinated with BCG. a case-control study. *Int J Epidemiol*, 17: 193-197., 1988.
- CDC. Culture examination and identification. In: (Eds) *Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory* Division of Laboratory Training and Consultation Laboratory Program Office - Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia: 121-157, 1985.

- CHAN, J.; TIAN, Y.; TANAKA, K.E.; TSANG, M.S.; YU, K.; SALGAME, P.; CARROLL, D.; KRESS, Y.; TEITELBAUM, R. & BLOOM, B.R. Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14857-14861, 1996.
- COHN, D.L. Use of the bacille Calmette-Guerin vaccination for the prevention of tuberculosis: renewed interest in an old vaccine. *Am J Med Sci*, 313: 372-376, 1997.
- COKER, R. Just coercion? Detention of nonadherent tuberculosis patients. *Ann N Y Acad Sci*, 953: 216-223, 2001.
- COKER, R. & van WEEZENBEEK, K.L. Mandatory screening and treatment of immigrants for latent tuberculosis in the USA: just restraint? *Lancet Infect Dis*, 1: 270-276, 2001.
- COLDITZ, G.A.; BREWER, T.F.; BERKEY, C.S.; WILSON, M.E.; BURDICK, E.; FINEBERG, H.V. & MOSTELLER, F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*, 271: 698-702, 1994.
- COMSTOCK, G.W. Efficacy of BCG vaccine. *JAMA*, 272: 766, 1994.
- CONDOS, R.; ROM, W.N.; LIU, Y.M. & SCHLUGER, N.W. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 729-735, 1998.
- COOPER, A.M. & FLYNN, J.L. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol*, 7: 512-516, 1995.
- Coordenacao Nacional de Pneumologia Sanitaria - CENEPI/FNS/MS. *Segundo informe tecnico sobre a vacinao/revacinacao BCG*. Brasilia: 1994. 56 p. 1994.

- DAI, G.; PHALEN, S. & MCMURRAY, D.N. Nutritional modulation of host responses to mycobacteria. *Front Biosci*, 3: E110-122., 1998.
- DANIEL, T.M.; BATES, J.H. & DOWNES, K.A. History of tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Eds) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. 1a ed, American Society for Microbiology, Washington, DC: 13-24, 1994.
- DANNENBERG Jr, A.M. & ROOK, G.A.W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses - dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Bloom, B. R. (Eds) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. 1a ed, American Society for Microbiology, Washington, DC: 459-483, 1994.
- de ALMEIDA, E.S.; BARBIERI, T.; GOMES, M.; GUEDES, E. & SOARES, L. [Tuberculosis infection and the use of oral and intradermal BCG in school children of Laranjal Paulista, Sao Paulo, Brazil]. *Rev Saude Publica*, 7: 189-197, 1973.
- de PADUA DIAS, M.H. & HAYASHI, A. [Tuberculin test, oral BCG and tuberculosis infection in children under 5 years old]. *Rev Saude Publica*, 12: 443-454, 1978.
- DOVE, A. US panel recommends major tuberculosis vaccine effort. *Nature Medicine*, 4: 1097, 1998.
- DOYAL, L. Moral problems in the use of coercion in dealing with nonadherence in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Ann NY Acad Sci*, 953: 208-215, 2001.
- EFFEREN, L.S. Tuberculosis: practical solutions to meet the challenge. *J Respir Dis*, 20: 772-785, 1999.

- EHLERS, S.; BENINI, J.; KUTSCH, S.; ENDRES, R.; RIETSCHEL, E.T. & PFEFFER, K. Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immun*, 67: 3571-3579, 1999.
- EHLERS, S.; KUTSCH, S.; EHLERS, E.M.; BENINI, J. & PFEFFER, K. Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55^{-/-} mice is dependent on T cells and IL-12. *J Immunol*, 165: 483-492, 2000.
- EL-ZAATARI, F.A.K.; NASER, S.A.; HULTEN, K.; BURCH, P. & GRAHAM, D.Y. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* p36 antigen and its seroreactivities in Crohn's disease. *Curr Microbiol*, 39: 115-119, 1999.
- ELLNER, J.J.; HIRSCH, C.S. & WHALEN, C.C. Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Infect Dis*, 30 Suppl 3: S279-282, 2000.
- ENARSON, D.A.; RIEDER, H.L.; ARDADOTTIR, T. & TREBUCQ, A. *Management of tuberculosis: a guide for low income countries*. 5a ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. 117. 2000.
- ENGMAN, D.M. & LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop*, 81: 123-132, 2002.
- EUZEBY, J.P. *List of bacterial names with standing in nomenclature*. <http://www.bacterio.cict.fr/>: 2002. Website, 2001.
- FARMER, P. DOTS and DOTS-Plus: not the only answer. *Ann N Y Acad Sci*, 953: 165-184, 2001.

- FERREIRA, E.S. *Imuno-regulacao por citocinas na tuberculose pulmonar - avaliacao pela tecnica de sangue total*. Salvador: 1999. Dissertacao de Mestrado Universidade Federal da Bahia/Fundacao Oswaldo Cruz, 1999.
- FINE, P.E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 346: 1339-1345, 1995.
- FINE, P.E.; BRUCE, J.; PONNIGHAUS, J.M.; NKHOSA, P.; HARAWA, A. & VYNNYCKY, E. Tuberculin sensitivity: conversions and reversions in a rural African population. *Int J Tuberc Lung Dis*, 3: 962-975, 1999.
- FINE, P.E.M. & RODRIGUES, L.C. Mycobacterial diseases. *Lancet*, 335: 1016-1020, 1990.
- FITZGERALD, J.M.; WANG, L.; ELWWOD, R.K. & TURNER, M.O. The impact of BCG on PPD testing. In: 32nd World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2001. *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: S20, 2001.
- FLYNN, J.L. & CHAN, J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 19: 93-129, 2001.
- FUNASA. *Guia de Doencas*. www.funasa.gov.br: 2002. Website, Fundacao Nacional de Saude/MS.
- FUNASA. *Imunizacoes: Calendario basico de vaccinacao 2001 2003*. www.funasa.gov.br: 2002. Website, Fundacao Nacional de Saude.
- FUNASA. *Situacao da Prevencao e Controle de Doencas de Notificacao Compulsoria e Endemicas no Brasil*. 1a ed. Brasilia, DF: Fundacao Nacional de Saude/MS, 2001.

- FUNASA. *Guia de vigilância epidemiologica*. 4a ed. Brasília, DF: Centro Nacional de Epidemiologia - FNS/MS, 523p. 1998a.
- FUNASA. *Manual de vigilância epidemiologica dos eventos adversos apos vacinação*. 1a ed. Brasília, DF: Coordenacao de Imunizacoes de Autosuficiencia em Imunobiologicos - FUNASA/MS, 102p. 1998b.
- GANGARDHARAM, P.R.J. & JENKINS, P.A. *Mycobacteria - Volume I: Basic Aspects*. 1a ed.: Kluwer Academic Publishers, 400 p. 1997.
- GUERIN, N.; TEULIERES, L.; NOBA, A.; SCHLUMBERGER, M.; BREGERE, P. & CHAUVIN, P. Comparison of the safety and immunogenicity of the lyophilized Merieux seed and the World Health Organization working reference BCG vaccines in school-aged children in Senegal. *Vaccine*, 17 1999.
- HAYWARD, A.C.; HERBERT, J. & WATSON, J.M. Tuberculosis drug resistance in England and Wales. How much is 'home grown'? *Epidemiol Infect*, 125: 463-464, 2000.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L. & LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*, 169: 59-72, 1989.
- HORWITCH, C. *Tuberculosis: its reemergence, resistance, and therapies*. http://cer.hs.washington.edu/em_inf/tb/tb2.html: 2002. Website, University of Washington - School of Public Health and Community Medicine, 2000.
- HSIEH, S.-M.; HUNG, C.-C.; CHEN, M.-Y.; SHENG, W.-H. & CHANG, S.-C. Dynamics of plasma cytokine levels in patients with advanced HIV infection and active tuberculosis:

implications for early recognition of patients with poor response to anti-tuberculous treatment. *AIDS*, 13: 935-941, 1999.

ITO, M.; KOJIRO, N.; SHIRASAKA, T.; MORIWAKI, Y.; TACHIBANA, I. & KOKUBU, T. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in tuberculous pleural effusions. *Chest*, 97: 1141-1143, 1990.

JACOBS, M.; BROWN, N.; ALLIE, N.; GULERT, R. & RYFFEL, B. Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. *Immunology*, 100: 494-501, 2000.

JOHNSON, P.D.; STUART, R.L.; GRAYSON, M.L.; OLDEN, D.; CLANCY, A.; RAVN, P.; ANDERSEN, P.; BRITTON, W.J. & ROTHEL, J.S. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6: 934-937, 1999.

KATIAL, R.K.; HERSHEY, J.; PUROHIT-SETH, T.; BELISLE, J.T.; BRENNAN, P.J.; SPENCER, J.S. & ENGLER, R.J.M. Cell-mediated Immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of in vitro gamma interferon production in whole-blood culture. *Clin Diag Lab Immunol*, 8: 339-345, 2001.

KEANE, J.; BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K.; REMOLD, H.G.; CHUPP, G.L.; MEEK, B.B.; FENTON, M.J. & KORNFELD, H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*, 65: 298-304, 1997.

KEANE, J.; REMOLD, H.G. & KORNFELD, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol*, 164: 2016-2020, 2000.

- KEMP, E.B.; BELSHE, R.B. & HOFT, D.F. Immune responses stimulated by percutaneous and intradermal Bacille Calmette-Guerin. *J Infect Dis*, 174: 113-119, 1996.
- KURASHIMA, K.; MUKAIDA, N.; FUJIMURA, M.; YASUI, M.; NAKAZUMI, Y.; MATSUDA, T. & MATSUSHIMA, K. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 155: 1474-1477, 1997.
- KVALE, G. Tackling the diseases of poverty. *Lancet*, 358: 845-846, 2001.
- LALVANI, A.; PATHAN, A.A.; DURKAN, H.; WILKINSON, K.A.; WHELAN, A.; DEEKS, J.J.; REECE, W.H.H.; LATIF, M.; PASVOL, G. & HILL, A.V.S. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet*, 357 2001.
- LEUNG, C.C.; TAM, C.M.; CHAN, S.L.; CHAN-YEUNG, M.; CHAN, C.K. & CHANG, K.C. Efficacy of the BCG revaccination programme in a cohort given BCG vaccination at birth in Hong Kong. *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: 717-723, 2001.
- LIBBS Farmacêutica LTDA. *Biblioteca eletrônica Libbs*. CD-ROM. Videolar S/A, 2000.
- LIN, Y.; ZHANG, M.; HOFMAN, F.M.; GONG, J. & BARNES, P.F. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun*, 64: 1351-1356, 1996.
- LUKEY, P.T.; LATOUF, S.E. & RESS, S.R. Memory lymphocytes from tuberculous effusions: purified protein derivative (PPD) stimulates accelerated activation marker expression and cell cycle progression. *Clin Exp Immunol*, 104: 412-418, 1996.
- MAES, R.F. Tuberculosis II: the failure of the BCG vaccine. *Med Hypotheses*, 53: 32-39, 1999.

- MANABE, Y.C. & BISHAI, W.R. Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence, patience, and winning by waiting. *Nature Med*, 6: 1327-1329, 2000.
- MARCHANT, A.; GOETGHEBUER, T.; OTA, M.O.; WOLFE, I.; CEESAY, S.J.; DE GROOTE, D.; CORRAH, T.; BENNETT, S.; WHEELER, J.; HUYGEN, K.; AABY, P.; MCADAM, K.P.W.J. & NEWPORT, M.J. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin vaccination. *J Immunol*, 163: 2249-2255, 1999.
- MASON, D. & POWRIE, F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*, 10: 649-655, 1998.
- MAZUREK, G.H.; LOBUE, P.A.; DALEY, C.L.; BERNARDO, J.; LARDIZABAL, A.A.; BISHAI, W.R.; IADEMARCO, M.F. & ROTHEL, J.S. Comparison of a whole-blood assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA*, 286: 1740-1747, 2001.
- MCMURRAY, D.N. Determinants of vaccine-induced resistance in animal models of pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis*, 33: 175-178, 2001.
- MENZIES, D. What does tuberculin reactivity after Bacille Calmette-Guerin vaccination tell us? *Clin Infect Dis*, 31: S71-74, 2000.
- MOREIRA, A.L.; TSENOVA-BERKOVA, L.; WANG, J.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; FREEMAN, S.; FREEDMAN, V.H. & KAPLAN, G. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis*, 78: 47-55, 1997.

- MURRAY, C.J.L. Issues in operational, social, and economic research on tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Eds) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. 1a ed, American Society for Microbiology, Washington, DC: 583-622, 1994.
- MURRAY, P.J. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol*, 7: 366-372, 1999.
- MURRAY, P.J. & YOUNG, R.A. Increased antimycobacterial immunity in Interleukin-10 deficient mice. *Infect Immun*, 67: 3087-3095, 1999.
- NASER, S.; SHAFRAN, I. & EL-ZAATARI, F. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's disease is serologically positive. *Clin Diag Lab Immunol*, 6: 282, 1999.
- NATAL, S. & ELIAS, M.V. Projeto de analise de informacao para tuberculose. *Bol Pneumol Sanit*, 8: 15-22, 2000.
- NATAL, S.; VALENTE, J.; GERHARDT, G. & PENNA, M.L. Modelo de predicao para o abandono do tratamento da tuberculose pulmonar. *Bol Pneumol Sanit*, 7: 65-78, 1999a.
- NATAL, S.; VALENTE, J.; GERHARDT, G. & PENNA, M.L. Situacao bacteriologica dos doentes de tuberculose que abandonaram o tratamento. *Bol Pneumol Sanit*, 7: 30-37, 1999b.
- OGAWA, T.; UCHIDA, H.; KUSUMOTO, Y.; MORI, Y.; YAMAMURA, Y. & HAMADA, S. Increase in Tumor Necrosis Factor Alpha- and Interleukin-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 59: 3021-3025, 1991.

- ORME, I.M. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. *Trends Microbiol*, 6: 94-97, 1998.
- ORME, I.M. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: 589-593, 2001a.
- ORME, I.M. The search for new vaccines against tuberculosis. *J Leukoc Biol*, 70: 1-10, 2001b.
- PAHO. *Country immunization profile: Brazil*. www.paho.org: 2001. Electronic bulletin, Pan-American Health Organization, WHO, 2001.
- PAIVA, A.M.; CARNAUBA JR, D.; SANTANA, J.J.; GUIMARAES, M.; ARAUJO, M.H. & SANTOS, T.P. Impacto das acoes implantadas no programa de controle da tuberculose do Hospital Universitario - UFAL sobre as taxas de abandono de tratamento. *Bol Pneumol Sanit*, 7: 43-50, 1999.
- PAUL, W.E. *Fundamental Immunology*. CD-ROM, Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
- PENNA, G.O.; TEIXEIRA, M.G. & PEREIRA, S.M. (Eds) Doencas de Interesse para a saude publica: tuberculose. In: *Doencas Infecciosas e Parasitarias: aspectos clinicos, vigilancia epidemiologica e medidas de controle. Guia de Bolso*. Centro Nacional de Epidemiologia - CENEPI/FUNASA/MS, Brasilia: 197-200, 2000.
- RAUPACH, B. & KAUFMANN, S.H.E. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol*, 13: 417-428, 2001.
- RAVIGLIONE, M.C.; GUPTA, R.; DYE, C.M. & ESPINAL, M.A. The burden of drug-resistant tuberculosis and mechanisms for its control. *Ann N Y Acad Sci*, 953: 88-97, 2001.

- RAVN, P.; BOESEN, H.; PEDERSEN, B.K. & ANDERSEN, P. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*, 158: 1949-1955, 1997.
- RHOADES, E.R.; FRANK, A.A. & ORME, I.M. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis*, 78: 57-66, 1997.
- RIEDER, H.L. *Epidemiologic basis of tuberculosis control*. 1a ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 161p. 1999.
- ROJAS, R.E.; BALAJI, K.N.; SUBRAMANIAN, A. & BOOM, W.H. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun*, 67: 6461-6472, 1999.
- ROJAS, M.; OLIVIER, M.; GROS, P.; BARRERA, L.F. & GARCIA, L.F. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol*, 162: 6122-6131, 1999.
- ROMANUS, V.; SVENSSON, A. & HALLANDER, H.O. The impact of changing BCG coverage on tuberculosis incidence in Swedish-born children between 1969 and 1989. *Tuberc Lung Dis*, 73: 150-161, 1992.
- ROPER, W.H. & WARING, J.J. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. *Am Rev Tuberc*, 71: 616-634, 1955.
- ROSEMBERG, J. Tuberculose - aspectos historicos, realidades, seu romantismo e transculturacao. *Bol Pneumologia Sanit*, 7: 5-29, 1999.

- RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35: 51-58, 2002.
- RUFFINO-NETTO, A. Controle da tuberculose no Brasil - atividades implementadas em 1999. *Bol Pneumologia Sanit*, 7: 58-66, 1999a.
- RUFFINO-NETTO, A. Impacto da reforma do setor saude sobre os servicos de tuberculose no Brasil. *Bol Pneumologia Sanit*, 7: 7-18, 1999b.
- SADEK, M.I.; SADA, E.; TOOSI, Z.; SCHWANDER, S.K. & RICH, E.A. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cel Mol Biol*, 19: 513-521, 1998.
- SANCHEZ-PEREZ, H.J.; FLORES-HERNANDEZ, J.A.; JANSA, J.M.; CAYLA, J.A. & MARTIN-MATEO, M. Pulmonary tuberculosis and associated factors in areas of high levels of poverty in Chiapas, Mexico. *Int J Epidemiol*, 30: 386-393, 2001.
- SATO, D.N. Mycobacterium. In: Silva, C. H. P. M. (Eds) *Bacteriologia: um texto ilustrado*. 1a ed, Eventos Livraria e Editora, Teresopolis, RJ, Brazil: 285-315, 1999.
- SAUNDERS, B.M.; FRANK, A.A. & ORME, I.M. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 98: 324-328, 1999.
- SCHLUGER, N.W. & ROM, W.N. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 679-691, 1998.
- SCHWANDER, S.K.; TORRES, M.; SADA, E.; CARRANZA, C.; RAMOS, E.; TARY-LEHMANN, M.; WALLIS, R.S.; SIERRA, J. & RICH, E.A. Enhanced responses to

Mycobacterium tuberculosis antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 178: 1434-1445, 1998.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L. & SHER, A. Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev*, 112: 161-182, 1989.

SEGATTO, C. & DAFLON, R. Um golpe no mal dos poetas. *Epoca Online*, 63: August 8, 1999.

SHIRAI, T.; SATO, A.; CHIDA, K.; TANIGUCHI, M.; NAKAZAWA, K.; KISHIMOTO, H. & WADA, R. [A study of causes of death among patients with active pulmonary tuberculosis from the standpoint of host factors]. *Kekkaku*, 65: 397-405., 1990.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L.M. & SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*, 2: 2001.

STERNE, J.A.; RODRIGUES, L.C. & GUEDES, I.N. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis*, 2: 200-207, 1998.

SUGAWARA, I.; YAMADA, H.; MIZUNO, S. & IWAKURA, Y. IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiol Immunol*, 44: 971-979, 2000.

SURCEL, H.-M.; TROYE-BLOMBERG, M.; PAULIE, S.; ANDERSSON, G.; MORENO, C.; PASVOL, G. & IVANYI, J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology*, 81: 171-176, 1994.

- SWAMINATHAN, S.; GONG, J.; ZHANG, M.; SAMTEN, B.; HANNA, L.E.; NARAYANAN, P.R. & BARNES, P.F. Cytokine production in children with tuberculous infection and disease. *Clin Infect Dis*, 28: 1290-1293, 1999.
- TRNKA, L.; DANKOVA, D.; ZITOVA, J.; CIMPRICHOVA, L.; MIGLIORI, G.B.; CLÁNCY, L. & ZELLWEGER, J.P. Survey of BCG vaccination policy in Europe: 1994-96. *Bull World Health Organ*, 76: 85-91, 1998.
- TURNER, J.; FRANK, A.A.; BROOKS, J.V.; MARIETTA, P.M. & ORME, I.M. Pentoxifyline treatment of mice with chronic pulmonary tuberculosis accelerates the development of destructive pathology. *Immunology*, 102: 248-253, 2001.
- VALLISHAYEE, R.S.; ANANTHARAMAN, D.S. & GUPTE, M.D. Tuberculin sensitivity and skin lesions in children after vaccination with two batches of BCG vaccine. *Indian J Lepr*, 70: 277-286, 1998.
- van CREVEL, R.; KARYADI, E.; PREYERS, F.; LEENDERS, M.; KULLBERG, B.-J.; NELWAN, R.H.H. & van der MEER, J.W.M. Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis*, 181: 1194-1197, 2000.
- van CREVEL, R.; van der VEN-JONGEKRIJG, J.; NETEA, M.G.; de LANGE, W.; KULLBERG, B.-J. & van der MEER, J.W.M. Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis. *J Immunol Methods*, 222: 145-153, 1999.
- VIA, L.E.; FRATTI, R.A.; MCFALONE, M.; PAGAN-RAMOS, E.; DERETIC, D. & DERETIC, V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci*, 111: 897-905, 1998.

WALLIS, R.S. & ELLNER, J.J. Cytokines and tuberculosis. *J Leukoc Biol*, 55: 676-681, 1994.

WEISS, K.B. & ADDINGTON, W.W. Tuberculosis: poverty's penalty. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 1011, 1998.

WILKINSON, R.J.; VORDERMEIER, H.M.; WILKINSON, K.A.; SJOLUND, A.; MORENO, C.; PASVOL, G. & IVANYI, J. Peptide-specific T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*: clinical spectrum, compartmentalization, and effect of chemotherapy. *J Infect Dis*, 178: 760-768, 1998.

World Health Organization. *Global tuberculosis control. WHO report 2000*. Geneva, Switzerland. 175 p. WHO/CDS/TB/2000.275, 2000.

World Health Organization. *Global Tuberculosis Control*. Geneva, Switzerland. 173 p. WHO/CDS/TB/2001.287, 2001.

WUNSCH FILHO, V.; DE CASTILHO, E.A.; RODRIGUES, L.C. & HUTTLY, S.R. Effectiveness of BCG vaccination against tuberculous meningitis: a case-control study in Sao Paulo, Brazil. *Bull World Health Organ*, 68: 69-74, 1990.

ZHANG, M.; LIN, Y.; IYER, D.V.; GONG, J.; ABRAMS, J.S. & BARNES, P.F. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 63: 3231-3234, 1995.

6 ANEXOS

CD25⁺CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. ANNACKER O.; PIMENTA-ARAÚJO R.; BURLIN-DEFRANOUX O..

BARBOSA T.C.; CUMANO A. AND BANDEIRA. A. *J. Immunol.* 2001, 166: 3008-18

CD25⁺ CD4⁺ T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-10¹

Oliver Annacker,² Ricardo Pimenta-Araujo, Odile Burlen-Defranoux, Theolis C. Barbosa,³ Ana Cumano, and Antonio Bandeira

The mechanisms by which the immune system achieves constant T cell numbers throughout life, thereby controlling autoaggressive cell expansions, are to date not completely understood. Here, we show that the CD25⁺ subpopulation of naturally activated (CD45RB^{low}) CD4 T cells, but not CD25⁻ CD45RB^{low} CD4 T cells, inhibits the accumulation of cotransferred CD45RB^{high} CD4 T cells in lymphocyte-deficient mice. However, both CD25⁺ and CD25⁻ CD45RB^{low} CD4 T cell subpopulations contain regulatory cells, since they can prevent naive CD4 T cell-induced wasting disease. In the absence of a correlation between disease and the number of recovered CD4⁺ cells, we conclude that expansion control and disease prevention are largely independent processes. CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells from IL-10-deficient mice do not protect from disease. They accumulate to a higher cell number and cannot prevent the expansion of CD45RB^{high} CD4 T cells upon transfer compared with their wild-type counterparts. Although CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells are capable of expanding when transferred in vivo, they reach a homeostatic equilibrium at lower cell numbers than CD25⁻ CD45RB^{low} or CD45RB^{high} CD4 T cells. We conclude that CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells from nonmanipulated mice control the number of peripheral CD4 T cells through a mechanism involving the production of IL-10 by regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 3008–3018.

The regulation of the magnitude of protective immunity to foreign Ags as well as the control of autoaggressive immune reactions are ensured by regulatory T cells. Regulatory CD4 T cells have been described in a variety of experimental systems to protect from autoimmune diseases (1–6) as well as from inflammatory bowel disease (IBD)⁴ (7, 8) and allograft rejection (9). Furthermore, regulatory CD4 T cells play a key role in the homeostasis of the peripheral CD4 T cell pool (10).

Useful surface markers for the discrimination between functional subsets of CD4 T cells are CD25 and CD45RB. CD25 is a component of the IL-2R and is transiently expressed on CD4 T cells after activation (11), and CD25⁺ T cells make up approximately 10% of the peripheral CD4 T cell pool. Transfer of CD25-depleted splenic cells into nude mice of susceptible strains leads to the development of organ-specific autoimmune diseases, which can be prevented by the cotransfer of purified CD25⁺ CD4 T cells (2, 3). Moreover, the lack of CD25⁺ cells allows for efficient clear-

ance of tumors, demonstrating the active suppression of anti-se self immune responses by regulatory T cells (12). CD25⁺ CD4 T cells were found to produce high levels of TGF- β and IL-10 compared with CD25⁻ CD4 T cells (3). Recently, it was shown that the protective effect of CD25⁺ CD4 T cells is dependent on CTLA-4 (13).

CD45RB is another marker of activation used for the discrimination of different CD4 T cell subsets. This surface molecule is up-regulated during thymic development (14), and its expression on naive CD4 T cells decreases upon activation (15). According to this marker, roughly one-third of CD4 T cells are activated in unmanipulated mice.

In an experimental system of IBD several groups showed that after transfer into immunodeficient recipients, naive CD45RB^{high} CD4 T cells cause a wasting disease characterized by intestinal inflammation (7, 8). High levels of IFN- γ and TNF- α are found both in the spleen and the intestine of the recipients (8, 16–18), and injected T cells can expand at least 200-fold under specific pathogen-free (SPF) conditions (10). In contrast, naturally activated CD45RB^{low} CD4 T cells usually do not induce disease, expand less, and protect the recipients from naive T cell-induced IBD (8, 10, 16, 17). This protective effect is dependent on TGF- β and IL-10 (17, 19–22). The CD45RB^{low} CD4 T cell pool contains most of the CD25⁺ CD4 T cells; the latter contribute one-third of the pool of CD45RB^{low} CD4 T cells. In a recent study Read et al. showed that the protection from IBD in this experimental system is enriched in the CD25⁺ T cell population within the CD45RB^{low} CD4 T cell pool and is also CTLA-4 dependent (23).

The general mechanisms regulating the expansion and survival of peripheral CD4 T cells are to date not well understood (for review, see Ref. 24). The peripheral T cell pool is divided into naive and an activated/memory compartment, which are apparently independently regulated (25, 26). The size of the activated/memory CD4 T cell pool is controlled by regulatory T cells within this pool (10). The administration of recombinant murine IL-10 to protected recipients reconstituted with CD45RB^{high} CD4 T cells from disease and decreased the number of recovered splenic CD

Unité du Développement des Lymphocytes, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 1961, Institut Pasteur, Paris, France

Received for publication October 23, 2000. Accepted for publication December 15, 2000.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (to A.C.) and by a grant from the Agence National de Recherches sur le SIDA. O.A. is supported by a fellowship from the European Union (ERBFM-BICT972686). R.P.A. is a Gulbenkian Foundation student from the PGDBM and is supported by Praxis XXI Fellowship BD/9804/96. T.C.B. was supported by a grant from Yakult S.A.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Oliver Annacker, Unité du Développement des Lymphocytes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. E-mail address: annacker@pasteur.fr

³ Current address: Laboratório de Imuno-Regulação e Microbiologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ, R. Waldemar Falcoo 121 Brotas, Salvador, Bahia, Brasil CEP 40295-001.

⁴ Abbreviations used in this paper: IBD, inflammatory bowel disease; SPF, specific pathogen-free; RAG-2⁻, recombination activating gene-2 deficient; IL-10⁻, IL-10 deficient; wt, wild type.

T cells (17), suggesting a role for IL-10 in the regulation of the expansion of peripheral CD4 T cells.

Here, we investigated the survival, the dynamics of expansion, and the homeostatic equilibrium of different peripheral CD4 T cell subpopulations from normal donors upon transfer into T and B cell-deficient mice, their regulatory properties, and the role of IL-10 in the expansion process. Our results show that although both CD25⁺ and CD25⁻ CD45RB^{low} CD4 T cell pools contain regulatory T cells, only the CD25⁻ population can efficiently regulate the size of the activated/memory CD4 T cell compartment via a mechanism involving the production of IL-10. Furthermore, our results show that control of CD4 T cell peripheral expansion and disease prevention are largely independent processes. Finally, the data demonstrate that although the CD25⁺ CD4 T cell population reaches a homeostatic equilibrium at low cell numbers, a fraction of these cells has a high potential of expansion upon transfer into lymphoid recipients.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6-Ly5.2 mice were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). C57BL/6-Ly5.1, C57BL/6 recombination-activating gene-2-deficient (RAG-2^o) and C57.BA (Thy1.1) mice were purchased from CDTA (Orleans, France). All animals were kept under SPF conditions in the animal facilities of the Institut Pasteur (Paris, France). C57BL/6-IL-10-deficient (IL-10^o) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and were bred under SPF conditions in our animal facilities. Donors and recipients were sex-matched and were used at 6–12 wk of age. IL-10^o donors were used at 5–8 wk of age.

Antibodies

The following mAbs were used: anti-Ly5.1-FITC or -PE (clone A.20); anti-CD4-biotin, -FITC, -PE, -Tricolor, or -allophycocyanin (L3T4); anti-CD8-FITC or -PE (CT-CD8a); anti-CD45RB-PE (23G2); anti-CD25-FITC (7D4) or -PE (PC61); anti-CD38-FITC (90); anti-CD69-PE (H1.2F3); anti-CD44-PE (IM7.8.1); and anti-Thy1.1-PE (Ox-7). All Abs were purchased from PharMingen (San Diego, CA) or Caltag (Burlingame, CA).

T cell preparations

Before sorting, splenic single-cell suspensions were first enriched for CD4⁺ or CD25⁺ cells by positive selection on midiMACS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were first incubated with biotinylated anti-CD4 Abs for 20 min on ice in PBS supplemented with 0.5% FCS, then incubated in the same buffer with streptavidin-microbeads for 15 min. The magnetically labeled positive fraction was retained on a midiMACS column. Alternatively, for the enrichment of CD25⁻ cells, FITC-labeled anti-CD25 Abs and anti-FITC-microbeads were used. In all cases, after enrichment the cells were labeled with anti-CD45RB-PE, anti-CD4-Tricolor, and anti-CD25-FITC Abs for 20 min on ice and then sorted on a FACStar^{plus} (Becton Dickinson, Mountain View, CA). For CD45RB, the brightest 40–50% and the dimmest 20–30% of CD4⁺ cells were sorted as high and low, respectively. CD25⁺ and CD25⁻ CD4 T cells were sorted out of the CD45RB^{low} population. The purity of the sorted populations was routinely >96%.

Labeling with CFSE

Labeling of cells with CFSE was performed as previously described (27). In brief, after washing FACS-sorted CD4 T cells twice in PBS, the cells were resuspended at 1–2 × 10⁷/ml PBS and incubated 10 min at room temperature with CFSE at a final concentration of 6 μM. This solution was incubated with an equal volume of FCS for an additional 2 min before washing twice with PBS.

Cell transfers

RAG-2^o mice were injected iv. or i.p. with 3 × 10⁵ CD4 T cells from FACS-sorted subpopulations. When cells were coinjected (at a ratio of 1:1), Ly5.1⁺ and Ly5.2⁺ donor cells were used. For CFSE-labeled cells, 0.5–1.5 × 10⁶ CD4 T cells from Ly5.1⁺ origin were injected i.v. Here, coinjections were made with Ly5.1⁺ and Thy1.1⁺ donors at a ratio of 1:1.

Preparation of intestinal cells

Whole intestines were first flushed extensively to eliminate the lumen content, then were longitudinally opened and cut into 1- to 2-cm pieces. They were incubated twice in OptiMEM medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) containing 5% FCS and 450 U of collagenase (Sigma, St. Louis, MO) for 20 min at 37°C. After filtering through gauze, lymphoid cells were isolated on a 40% Percoll gradient. The cells were then washed and stained for flow cytometric analysis.

Flow cytometric analysis

Single-cell suspensions from spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; or intestine were incubated for 20 min at 4°C in microplates with 50 μl of the appropriate Ab preparations in PBS supplemented with 3% FCS and 0.01% azide. When possible, one million cells were stained. Alternatively, the whole organ cell suspension was used. The concentrations used were tested for optimal stainings of splenic cell samples before experimental use. Dead cells were excluded from the analysis by propidium iodide. Blood samples were first stained with appropriate Abs before lysing erythrocytes with FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Flow cytometric analysis was performed on a FACScan (Becton Dickinson) using CellQuest software (Becton Dickinson).

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, analysis was performed using the unpaired *t* test. In cases where the variances between compared groups were significantly different, the unpaired *t* test was modified with Welch's correction. The data were considered significantly different at *p* < 0.05.

Results

The incidence of CD4 T cell-induced wasting in lymphoid mice correlates with the frequency of CD25⁺ cells in the transferred population

Splenic CD4 T cells from normal unmanipulated mice were sorted into four subpopulations according to the expression of CD45 and CD25 markers: 1) CD45RB^{high} cells, hereafter denoted RB^{high}; 2) CD45RB^{low} cells (of which about one-third is CD25⁺ denoted RB^{low}); 3) CD45RB^{low} cells, which were depleted of CD25⁺ cells, denoted 25⁻ RB^{low}; and 4) CD45RB^{low} cells expressing the CD25 marker, hereafter referred to as 25⁺ RB^{low} CD4 T cells (Fig. 1A).

Syngenic RAG-2^o mice, kept under SPF conditions, received 3 × 10⁵ of either sorted CD4 T cell subset. The weight of recipients was scored twice a week, and animals were sacrificed after 12–14 wk or when they lost at least 20% of their initial weight.

Mice injected with (naive) RB^{high} T cells invariably developed signs of wasting. Only one of eight animals survived for 12 wk after transfer (Fig. 1B), and all recipients lost weight (Fig. 1) and developed diarrhea, and had a markedly enlarged colon upon analysis. Noninjected control RAG-2^o mice kept under the same conditions never developed signs of wasting or diarrhea (data not shown). In the group of animals that received the total pool of RB^{low} cells, one of seven mice became sick (Fig. 1C) and was sacrificed 8 wk after transfer (Fig. 1B). Half of the recipients of 25⁻ RB^{low} pool remained healthy throughout the experimental period of 3.5 mo (Fig. 1C). The other half suffered from wasting but the disease progressed more slowly compared with that in recipients of RB^{high} T cells, and only two of them lost >20% of their initial body weight within 12 wk after transfer (Fig. 1B). The experimental group in which all recipients invariably gained weight and did not develop signs of wasting was the one injected with 25⁺ RB^{low} T cells (Fig. 1C). Thus, the incidence of a wasting disease in lymphoid recipients after transfer of different CD4 T cell populations appears to correlate with the frequency of CD25⁺ cells in the transferred population.

T cells (17), suggesting a role for IL-10 in the regulation of the expansion of peripheral CD4 T cells.

Here, we investigated the survival, the dynamics of expansion, and the homeostatic equilibrium of different peripheral CD4 T cell subpopulations from normal donors upon transfer into T and B cell-deficient mice, their regulatory properties, and the role of IL-10 in the expansion process. Our results show that although both CD25⁺ and CD25⁻ CD45RB^{low} CD4 T cell pools contain regulatory T cells, only the CD25⁺ population can efficiently regulate the size of the activated/memory CD4 T cell compartment via a mechanism involving the production of IL-10. Furthermore, our results show that control of CD4 T cell peripheral expansion and disease prevention are largely independent processes. Finally, the data demonstrate that although the CD25⁺ CD4 T cell population reaches a homeostatic equilibrium at low cell numbers, a fraction of these cells has a high potential of expansion upon transfer into lymphoid recipients.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6-Ly5.2 mice were obtained from Janvier (Le Genest-St-Isle, France). C57BL/6-Ly5.1, C57BL/6 recombination-activating gene-2-deficient (RAG-2^o) and C57.BA (Thy1.1) mice were purchased from CDTA (Orleans, France). All animals were kept under SPF conditions in the animal facilities of the Institut Pasteur (Paris, France). C57BL/6-IL-10-deficient (IL-10^o) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and were bred under SPF conditions in our animal facilities. Donors and recipients were sex-matched and were used at 6–12 wk of age. IL-10^o donors were used at 5–8 wk of age.

Antibodies

The following mAbs were used: anti-Ly5.1-FITC or -PE (clone A.20); anti-CD4-biotin, -FITC, -PE, -Tricolor, or -allophycocyanin (L3T4); anti-CD8-FITC or -PE (CT-CD8a); anti-CD45RB-PE (23G2); anti-CD25-FITC (7D4) or -PE (PC61); anti-CD38-FITC (90); anti-CD69-PE (H1.2F3); anti-CD44-PE (IM7.8.1); and anti-Thy1.1-PE (Ox-7). All Abs were purchased from Pharmingen (San Diego, CA) or Caltag (Burlingame, CA).

T cell preparations

Before sorting, splenic single-cell suspensions were first enriched for CD4⁺ or CD25⁺ cells by positive selection on midiMACS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were first incubated with biotinylated anti-CD4 Abs for 20 min on ice in PBS supplemented with 0.5% FCS, then incubated in the same buffer with streptavidin-microbeads for 15 min. The magnetically labeled positive fraction was retained on a midiMACS column. Alternatively, for the enrichment of CD25⁺ cells, FITC-labeled anti-CD25 Abs and anti-FITC-microbeads were used. In all cases, after enrichment the cells were labeled with anti-CD45RB-PE, anti-CD4-Tricolor, and anti-CD25-FITC Abs for 20 min on ice and then sorted on a FACStar^{Plus} (Becton Dickinson, Mountain View, CA). For CD45RB, the brightest 40–50% and the dimmest 20–30% of CD4⁺ cells were sorted as high and low, respectively. CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ T cells were sorted out of the CD45RB^{low} population. The purity of the sorted populations was routinely >96%.

Labeling with CFSE

Labeling of cells with CFSE was performed as previously described (27). In brief, after washing FACS-sorted CD4 T cells twice in PBS, the cells were resuspended at $1-2 \times 10^7$ /ml PBS and incubated 10 min at room temperature with CFSE at a final concentration of 6 μ M. This solution was incubated with an equal volume of FCS for an additional 2 min before washing twice with PBS.

Cell transfers

RAG-2^o mice were injected i.v. or i.p. with 3×10^5 CD4 T cells from FACS-sorted subpopulations. When cells were coinjected (at a ratio of 1:1), Ly5.1⁺ and Ly5.2⁺ donor cells were used. For CFSE-labeled cells, $0.5-1.5 \times 10^6$ CD4 T cells from Ly5.1⁺ origin were injected i.v. Here, coinjections were made with Ly5.1⁺ and Thy1.1⁺ donors at a ratio of 1:1.

Preparation of intestinal cells

Whole intestines were first flushed extensively to eliminate the lumen content, then were longitudinally opened and cut into 1- to 2-cm pieces. These were incubated twice in OptiMEM medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) containing 5% FCS and 450 U of collagenase (Sigma, St. Louis, MO) for 20 min at 37°C. After filtering through gauze, lymphoid cells were isolated on a 40% Percoll gradient. The cells were then washed and stained for flow cytometric analysis.

Flow cytometric analysis

Single-cell suspensions from spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; or intestine were incubated for 20 min at 4°C in microtiter plates with 50 μ l of the appropriate Ab preparations in PBS supplemented with 3% FCS and 0.01% azide. When possible, one million cells were stained. Alternatively, the whole organ cell suspension was used. The Ab concentrations used were tested for optimal stainings of splenic control samples before experimental use. Dead cells were excluded from the analysis by propidium iodide. Blood samples were first stained with appropriate Abs before lysing erythrocytes with FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Flow cytometric analysis was performed on a FACScan (Becton Dickinson) using CellQuest software (Becton Dickinson).

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, analysis was performed using the unpaired *t* test. In cases where the variances between compared groups were significantly different, the unpaired *t* test was modified with Welch's correction. The data were considered significantly different at $p < 0.05$.

Results

The incidence of CD4 T cell-induced wasting in lymphoid mice correlates with the frequency of CD25⁺ cells in the transferred population

Splenic CD4 T cells from normal unmanipulated mice were sorted into four subpopulations according to the expression of CD45RB and CD25 markers: 1) CD45RB^{high} cells, hereafter denoted RB^{high}; 2) CD45RB^{low} cells (of which about one-third is CD25⁺), denoted RB^{low}; 3) CD45RB^{low} cells, which were depleted of CD25⁺ cells, denoted 25⁻ RB^{low}; and 4) CD45RB^{low} cells expressing the CD25 marker, hereafter referred to as 25⁺ RB^{low} CD4 T cells (Fig. 1A).

Syngenic RAG-2^o mice, kept under SPF conditions, received 3×10^5 of either sorted CD4 T cell subset. The weight of the recipients was scored twice a week, and animals were sacrificed after 12–14 wk or when they lost at least 20% of their initial weight.

Mice injected with (naive) RB^{high} T cells invariably developed signs of wasting. Only one of eight animals survived for 12 wk after transfer (Fig. 1B), and all recipients lost weight (Fig. 1C), developed diarrhea, and had a markedly enlarged colon upon analysis. Noninjected control RAG-2^o mice kept under the same conditions never developed signs of wasting or diarrhea (data not shown). In the group of animals that received the total pool of RB^{low} cells, one of seven mice became sick (Fig. 1C) and was sacrificed 8 wk after transfer (Fig. 1B). Half of the recipients of the 25⁻ RB^{low} pool remained healthy throughout the experimental period of 3.5 mo (Fig. 1C). The other half suffered from wasting, but the disease progressed more slowly compared with that in recipients of RB^{high} T cells, and only two of them lost >20% of their initial body weight within 12 wk after transfer (Fig. 1B). The only experimental group in which all recipients invariably gained weight and did not develop signs of wasting was the one injected with 25⁺ RB^{low} T cells (Fig. 1C). Thus, the incidence of a wasting disease in lymphoid recipients after transfer of different CD4 T cell populations appears to correlate with the frequency of CD25⁺ cells in the transferred population.

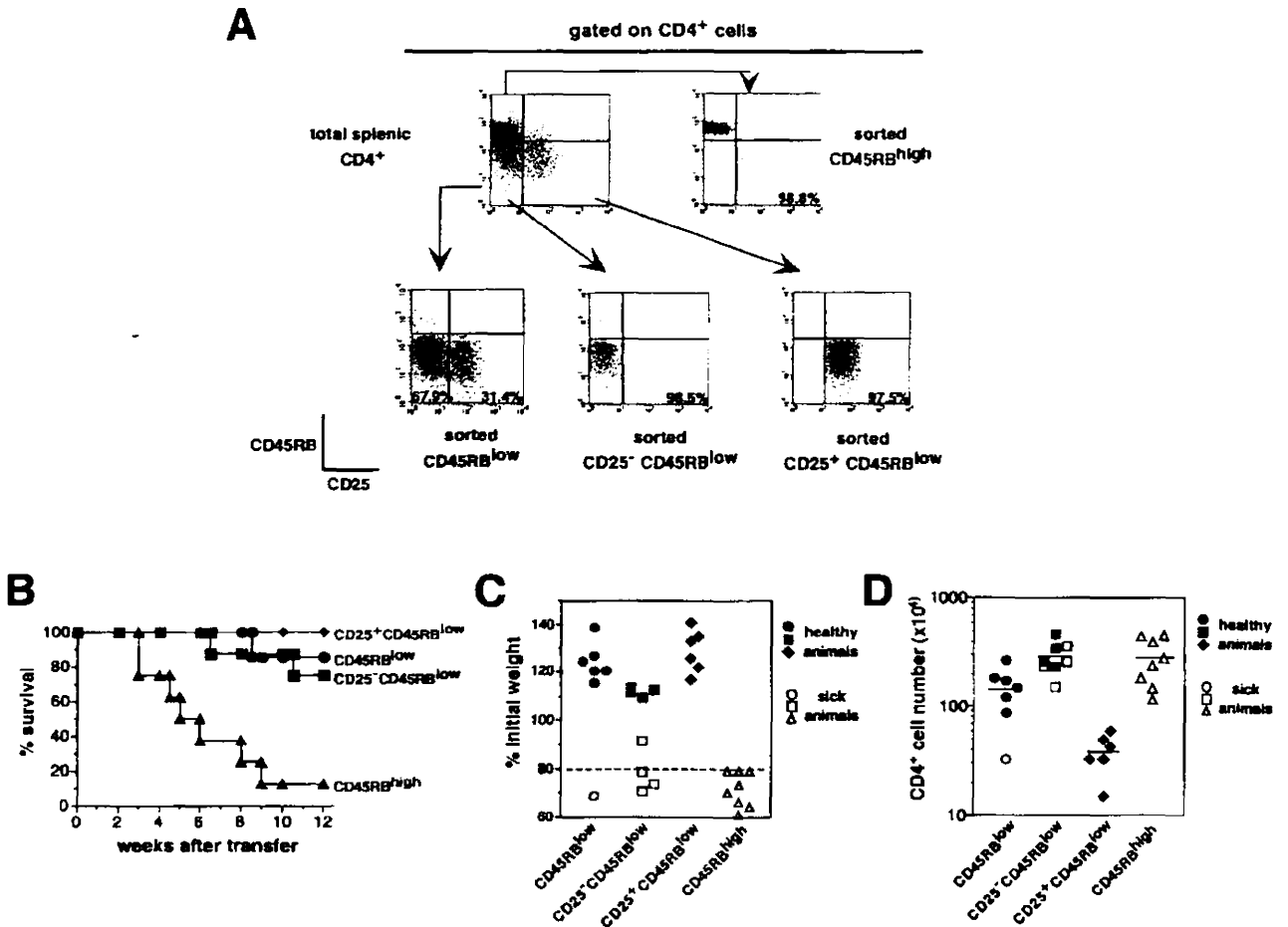


FIGURE 1. Incidence of wasting disease and T cell numbers at equilibrium in lymphoid recipients reconstituted with different CD4 T cell subsets. Sorted normal CD4 T cells of the indicated phenotype (3×10^5) were transferred into syngenic RAG-2⁰ hosts. **A**, FACS profiles of sorted CD4 populations before injection. **B**, The time of sacrifice for each recipient (six to eight recipients per group), either 12–14 wk after transfer or when they lost at least 20% of their original weight. **C**, Body weight of the recipients at the time of sacrifice. Sick animals were defined by weight loss below their initial weight, which was associated with diarrhea and a markedly enlarged colon. **D**, Sum of the number of CD4⁺ cells in spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; blood (assuming 3 ml of blood per animal); and intestine. The background of noninjected control RAG-2⁰ mice was 1.3×10^5 CD4⁺ cells ($n = 4$). The data are pooled from three or four independent experiments per group.

Peripheral expansion of CD4 T cell subsets: CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells reach homeostatic equilibrium at low cell numbers

To assess the accumulation and the respective homeostatic equilibrium of the injected T cell populations, at the time of sacrifice the number of CD4⁺ cells was scored in the spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; as well as blood and intestine of all the recipients described in the previous section. In this series of transfers, on the average, 2.9×10^6 CD4 T cells were recovered from mice injected with RB^{high} T cells (Fig. 1D). In animals injected with the total pool of naturally activated/memory RB^{low} T cells, we could only score half the number of cells found in the previous group (on the average, 1.4×10^6 ; $p < 0.03$), as shown previously (10). Interestingly, the number of cells (on the average, 2.9×10^6) obtained from mice reconstituted with 25⁻ RB^{low} T cells was similar to that scored in recipients of RB^{high} T cells regardless of the state of health of the recipients (Fig. 1D) and the time point of sacrifice. Finally, recipients of 25⁺ RB^{low} T cells only yielded approximately the number of cells injected (on the average, 3.9×10^5), that is, 7-fold less compared with the 25⁻ RB^{low} ($p < 0.0001$) or the RB^{high} ($p < 0.001$) population and about 4-fold less compared with recipients of unfractionated RB^{low} T cells ($p < 0.01$; Fig. 1D).

The organ distribution of the CD4⁺ cells in all groups of mice is shown in Table I. The majority of T cells were found in the spleen, accounting for roughly half of the recovered CD4 T cells. In the intestine, with the exception of recipients of the 25⁺ RB^{low} fraction, similar numbers of CD4 T cells were recovered in both healthy and sick animals in all other groups (Table I). However, it cannot be formally excluded that the observed differences in cell numbers between different CD4 T cell subsets are due not to different expansions of these cells, but to a differential migration pattern predominantly into other organs, such as liver, lung, or bone marrow, which have not been investigated here.

In conclusion, disease is directly correlated neither with the total number of T cells recovered from the recipients nor with the number of T cells present in the intestine. In addition, the 25⁺ RB^{low} T cell population accumulates to low cell numbers after transfer into RAG-2⁰ hosts and is barely detectable in the intestine.

Both CD25⁺ and CD25⁻ CD45RB^{low} CD4 T cells contain regulatory cells capable of preventing a wasting disease induced by naive CD4 T cells

In the experiments described above (see Fig. 1), half of the recipients of the 25⁻ RB^{low} T cell population became sick, whereas the other half remained healthy for at least 3 mo. This differential

Table I. Organ distribution of CD4⁺ cells in RAG-2^o mice reconstituted with different CD4 subpopulations^a

Phenotype of Injected CD4 ⁺ Subpopulations	No. of Animals	No. of Recovered CD4 ⁺ Cells ($\times 10^4$) ^b			
		Spleen	Lymph Nodes ^c	Blood ^d	Intestine
CD45RB ^{low}	7	75.7 (± 21.5)	20.2 (± 5.1)	7.6 (± 1.6)	29.1 (± 5.9)
CD25 ⁻ CD45RB ^{low}	8	140.3 (± 26.7)	48.0 (± 12.4)	27.1 (± 8.1)	19.9 (± 7.6)
CD25 ⁺ CD45RB ^{low}	6	20.9 (± 4.4)	11.0 (± 1.8)	1.9 (± 0.4)	1.1 (± 0.4)
CD45RB ^{high}	8	105.1 (± 33.4)	31.5 (± 11.0)	38.3 (± 10.6)	35.1 (± 8.3)

^a RAG-2^o recipients were injected with 3×10^5 FACS-sorted CD4 T cells. The animals were analyzed for the presence of CD4⁺ cells in the indicated organs after 12–14 wk or when they dropped below 80% of their starting weight.

^b Average \pm SEM.

^c Axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes.

^d Data are expressed as cell number per milliliter of blood.

outcome could be the result of differences in the frequency of potentially pathogenic or, alternatively, of regulatory T cells in the individual inoculums of this CD4 T cell subset.

To directly assess the presence of regulatory activity in the two CD45RB^{low} subpopulations, RAG-2^o recipients were coinjected with 3×10^5 RB^{high} T cells and 3×10^5 CD4 T cells of either the 25⁺ or 25⁻ RB^{low} T cell subset (Fig. 2A). The majority of the animals injected with these mixtures were protected from disease (Fig. 2B), and a similar fraction of animals in both groups developed a wasting disease with similar kinetics (Fig. 2C). In conclusion, the CD25⁻ CD45RB^{low} T cell subpopulation contained suf-

ficient regulatory activity to prevent CD4 T cell-induced wasting in 40% of the recipients.

CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells control the size of the activated/memory CD4 T cell pool

The cell recovery from recipients of the total RB^{low} T cell pool was significantly different from that of either 25⁻ or 25⁺ subfractions (see Fig. 1). This could be interpreted to indicate that the restricted expansion of total RB^{low} T cells after transfer into RAG-2^o hosts was due to control of the accumulation of 25⁻ RB^{low} T cells exerted by 25⁺ RB^{low} T cells. To investigate whether the

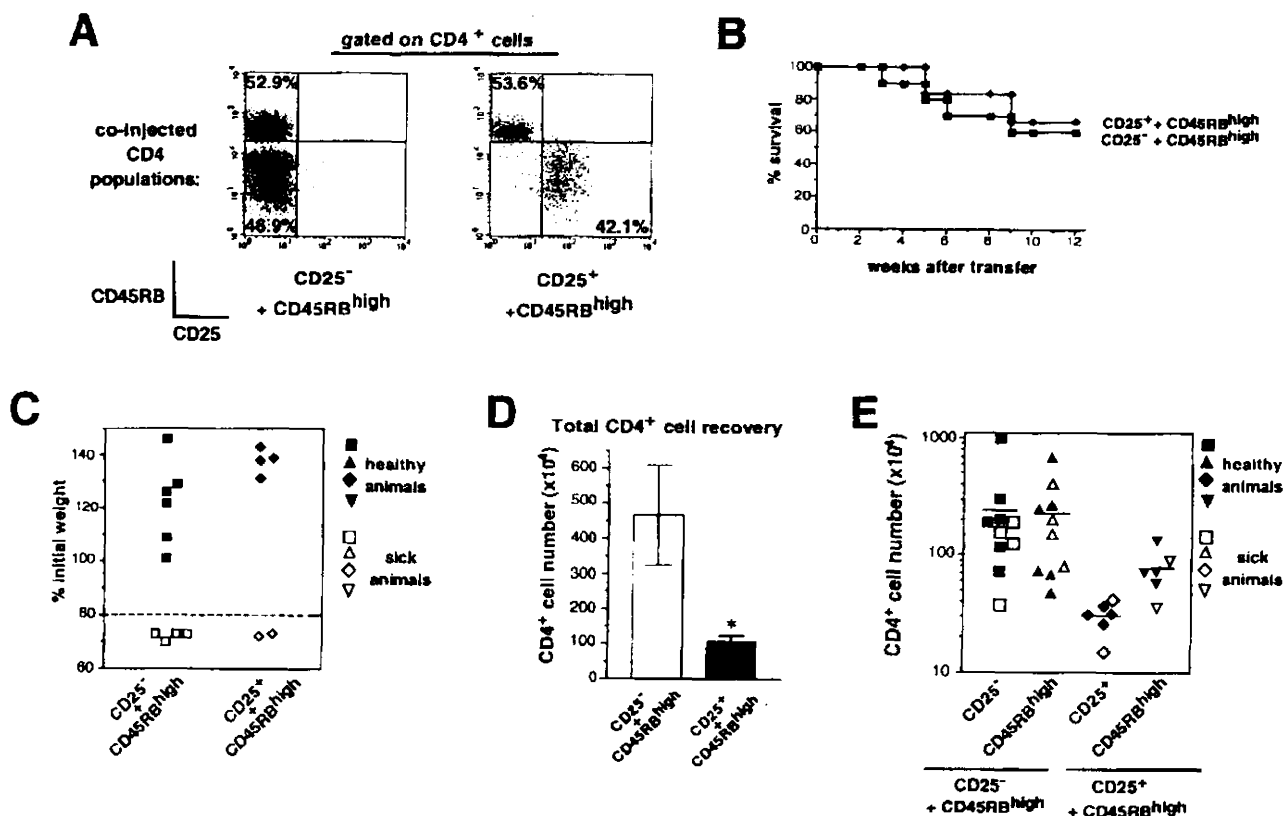


FIGURE 2. CD25⁺, but not CD25⁻ CD45RB^{low}, CD4 T cells inhibit the accumulation of CD45RB^{high} CD4 T cells transferred into RAG-2^o hosts. Sorted CD25⁻CD45RB^{low} (CD25⁻) or CD25⁺CD45RB^{low} (CD25⁺) CD4 T cells (3×10^5) were coinjected with 3×10^5 CD45RB^{high} CD4 T cells into RAG-2^o hosts. *A*, FACS profiles of the coinjected populations. *B*, Recipients were sacrificed at 12–14 wk after transfer or when they dropped below 80% of their starting weight as indicated by the survival curve. *C*, Weight of the recipients at sacrifice (time points of sacrifice as indicated in *B*). Sick animals were defined as described in Fig. 1. *D*, Sum of the total CD4⁺ cell numbers scored in spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; blood (assuming 3 ml of blood per animal); and intestine. The mean (\pm SEM) is shown. *, The difference is statistically significant ($p < 0.04$, by unpaired *t* test with Welch's correction). *E*, CD4⁺ cell number for each donor population in the two groups of recipients. CD4⁺ cells from different origins were identified by the expression of different Ly5 isoforms. The data are pooled from three independent experiments. The difference between recovered CD45RB^{high} T cell numbers in the two groups is statistically significant ($p < 0.05$, by unpaired *t* test with Welch's correction; see also text).

CD25⁺ T cell pool is indeed responsible for control of the size of the activated/memory CD4 T cell compartment, we analyzed the coinjected recipients (see Fig. 2) for the level of T cell reconstitution either 12–14 wk after transfer or when the recipients dropped to <80% of their initial weight. The identification of the origin of each donor population was based on the expression of the Ly5.1 and Ly5.2 markers.

The total CD4 T cell recovery from mice injected with mixed 25⁻ RB^{low} and RB^{high} T cells was >4-fold higher compared with that in animals that received mixed 25⁺ RB^{low} and RB^{high} cells ($p < 0.04$, by unpaired *t* test with Welch's correction; Fig. 2D). In the group cotransferred with 25⁻ RB^{low} and RB^{high} T cells both populations expanded to similar numbers as those scored in animals injected with either population alone (Figs. 2E and 1D), with a similar distribution of each subset in all organs (Table II). Again, no significant difference was observed between healthy and sick animals (Fig. 2E).

In the group of recipients injected with 25⁺ RB^{low} and RB^{high} cells, similar numbers of 25⁺ RB^{low} T cells were recovered as from animals injected with these cells alone regardless of the presence of RB^{high} T cells in the injected animals (Fig. 2E). However, approximately 4-fold less T cells of originally RB^{high} T cells were scored in these animals compared with recipients of RB^{high} T cells injected alone ($p < 0.004$) or coinjected with 25⁻ RB^{low} T cells ($p < 0.05$, by unpaired *t* test with Welch's correction). T cell numbers were mostly reduced in spleen, blood, and intestine (Table II). Interestingly, the relative frequency of originally 25⁺ RB^{low} to RB^{high} T cells in the intestine was 1:10 to 1:20, since 25⁺ RB^{low} T cells were again barely detected in the intestine (Table II). This ratio was independent of the health state of the mice, and the presence of 25⁺ RB^{low} T cells did not inhibit the activation of the original RB^{high} T cells, as assessed by the low density of the CD45RB marker (Fig. 3).

Taken together, these results show that the 25⁺, but not the 25⁻, RB^{low} T cell population has the potential to efficiently inhibit the accumulation of other CD4 T cells. Here again, no direct correlation was found between the magnitude of T cell accumulation and the incidence of wasting disease in any of the experimental groups.

CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells can expand in vivo

CD25⁺ T cells do not expand upon stimulation with anti-CD3 Abs in vitro (28, 29), which was interpreted to reflect an anergic state of these cells (28). The reconstitution of RAG-2^o mice with 25⁺ RB^{low} cells yielded approximately the number of cells injected (see above). However, because in transfer experiments only a minority of the injected cells survives in the host 24–48 h after transfer (10), this suggested that the CD25⁺ T cell population could nevertheless expand to a certain extent in the recipients.

To more accurately address this issue, CD4 T cells from normal Ly5.1⁺ donors were sorted into three subpopulations according to

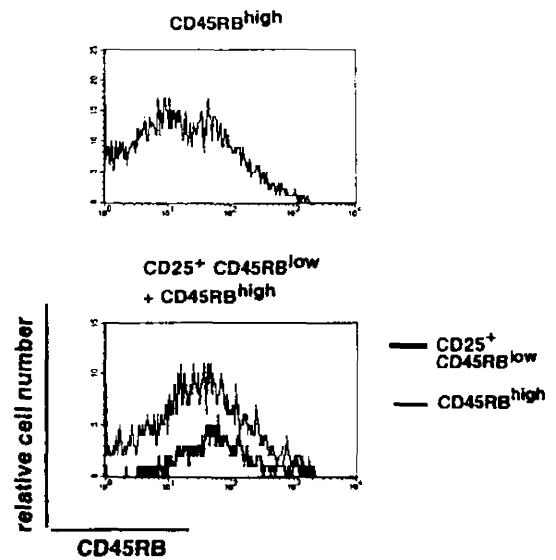


FIGURE 3. Originally CD45RB^{high} CD4 T cells acquire an activated/memory (CD45RB^{low}) phenotype after transfer into RAG-2^o animals, which is not inhibited by the presence of CD25⁺ CD45RB^{low} T cells. At sacrifice, mice injected with sorted CD4 T cells, as shown in Figs. 1 and 2, were analyzed for the expression of CD45RB. Shown are representative stainings for CD45RB on gated CD4⁺ cells in mesenteric lymph nodes. CD4⁺ cells from different origins were identified by the expression of different Ly5 isoforms. Note the density of CD45RB on sorted populations shown in Figs. 1A and 2A.

the expression of CD25 and CD45RB and were labeled with CFSE. Then, $0.5\text{--}1.5 \times 10^6$ cells of each subset were separately injected into congenic Ly5.2⁺ RAG-2^o hosts. Thirty-six to 48 h after transfer, donor-derived CD4 T cells were analyzed in the peripheral lymphoid organs, the blood, and the gut. While no donor cells were recovered from the intestine, the bulk of the populations were found in the spleen. Naive RB^{high} T cells survived much better than naturally activated 25⁻ or 25⁺ RB^{low} T cells (Fig. 4C). On the average 2.6% of the RB^{high} T cell population could be recovered at this early time point, whereas only 1.1 and 0.3% of injected 25⁻ and 25⁺ RB^{low} T cells, respectively, were recovered. At this time point, very few of the injected cells had divided, as assessed by CFSE staining (data not shown).

In the following days all populations expanded, and 12 days after transfer very few cells from any of the injected populations remained CFSE positive, indicating that in all cases the bulk of the cells present at this time point went through a minimum of six rounds of division. As shown in Fig. 4C, 4- and 6.8-fold the number of injected cells were recovered from recipients of 25⁻ RB^{low}

Table II. Organ distribution of CD4⁺ cells in RAG-2^o mice reconstituted with coinjected CD4 subpopulations^a

Coinjected Populations	No. of Animals	Phenotype of Injected CD4 ⁺ Subpopulations	No. of Recovered CD4 ⁺ Cells ($\times 10^4$) ^b			
			Spleen	Lymph Nodes ^c	Blood ^d	Intestine
CD25 ⁻ + CD45RB ^{high}	10	CD25 ⁻ CD45RB ^{high}	139.0 (± 68.1)	28.2 (± 7.7)	16.0 (± 4.0)	26.0 (± 10.8)
			129.0 (± 54.5)	18.3 (± 4.2)	16.5 (± 4.6)	26.1 (± 8.8)
CD25 ⁺ + CD45RB ^{high}	6	CD25 ⁺ CD45RB ^{high}	16.7 (± 2.7)	8.5 (± 1.9)	1.3 (± 0.3)	1.2 (± 0.8)
			32.1 (± 5.4)	16.4 (± 2.9)	5.9 (± 1.8)	10.9 (± 4.2)

^a RAG-2^o recipients were injected with 3×10^5 FACS-sorted CD4 T cells of either population as indicated. Differentiation of the origin of the cells was achieved by using Ly5-congenic donors. The animals were analyzed for the presence of CD4⁺ cells in the indicated organs after 12–14 wk or when they dropped below 80% of their starting weight.

^b Average \pm SEM.

^c Axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes.

^d Data are expressed as cell number per milliliter of blood.

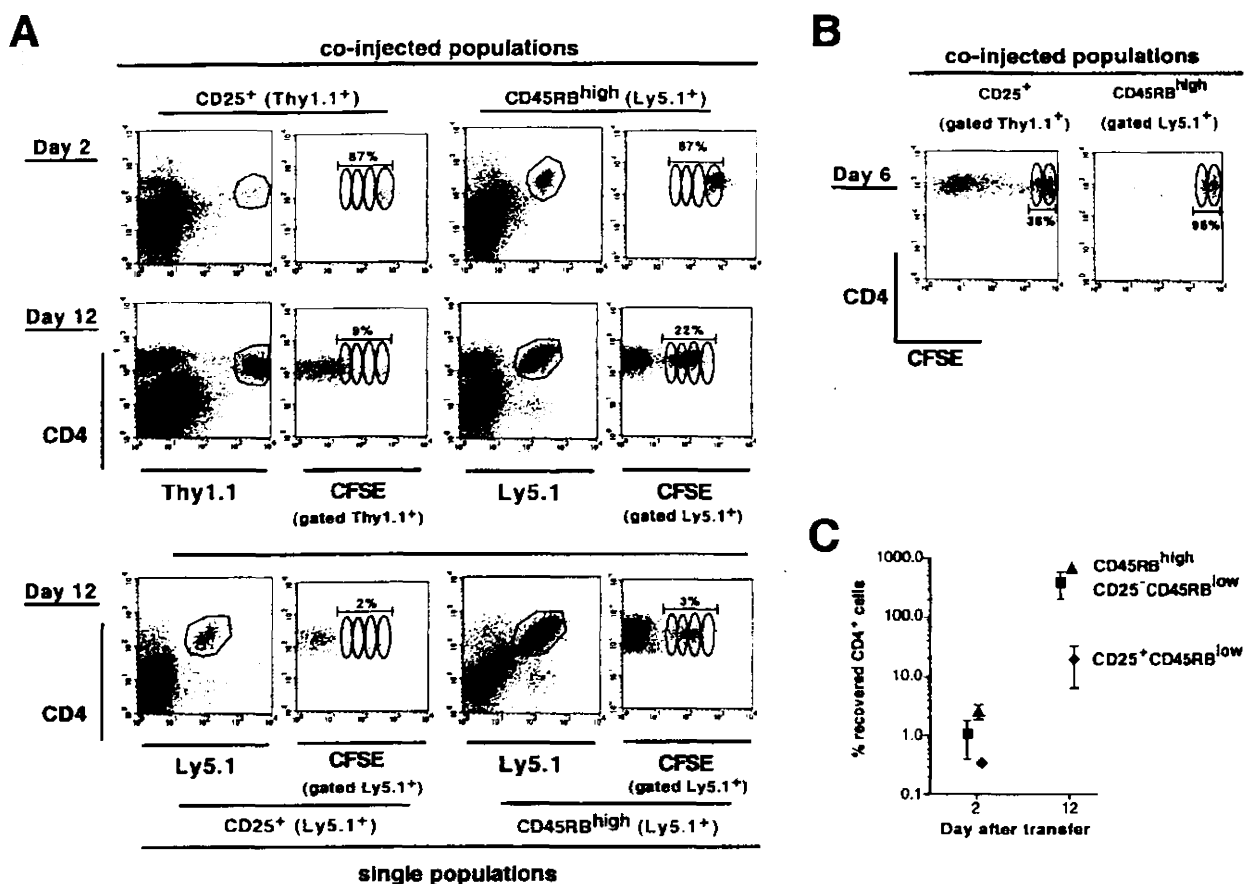


FIGURE 4. Regulatory CD4 T cells can expand in vivo. C57BL/6 RAG-2^{-/-} hosts were injected with $0.5\text{--}1.5 \times 10^6$ FACS-sorted and CFSE-labeled CD4⁺ cell subsets of donor mice congenic for the Thy1.1 or Ly5 allotype marker. *A*, Representative staining pattern for the presence of donor cells and the corresponding CFSE pattern of these cells in the spleen on different days after reconstitution as indicated. Coinjections were performed at a ratio of 1:1. The survival and the recovery of CD25⁺ cells were similar in recipients of single or mixed injections. The number of CD45RB^{high} T cells in coinjected mice was similar to that in recipients of these cells alone on day 2, but the recovery after 12 days was strongly reduced (see text). *B*, Expansion of CD4 T cells of the indicated donor phenotype 6 days after transfer in coinjected recipients. The data are from an experiment performed independently of those shown in *B*. *C*, Total CD4 T cell numbers in spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; blood (assuming 3 ml of blood per animal); and intestine in the recipients of the indicated populations (two to five mice per group). Data represent the CD4 T cells recoveries as a percentage of the number of injected cells (average \pm SEM). The lack of error bars indicates that the deviation is smaller than the symbols.

and of RB^{high} T cells, respectively. In contrast, recipients of 25⁺ RB^{low} T cells contained 20% of the number of injected cells. However, taking into account the differential survival of the injected populations in the three groups of recipients, the increase in cell numbers over the surviving populations on day 2 was 60-fold for the 25⁺ RB^{low} T cell population (corresponding to five rounds of division of the surviving T cells), compared with 360- and 260-fold for the 25⁻ RB^{low} and the RB^{high} T cell populations (equivalent to seven or eight rounds of division), respectively (Fig. 4C).

In conclusion, these results show that a fraction of the 25⁺ RB^{low} cells has an expansion capacity not very different from that of the 25⁻ RB^{low} or RB^{high} T cells. The lower reconstitution capacity of CD25⁺ cells 3.5 mo after transfer probably reflects a difference in the homeostatic regulation of steady state numbers in these populations.

CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells regulate the size of the CD45RB^{high} CD4 T cell compartment early after transfer

In these series of experiments CFSE-labeled 25⁺ RB^{low} and RB^{high} T cells were also coinjected into RAG-2^{-/-} recipients, and the mice were analyzed 2, 6, and 12 days later. On day 2 after transfer no significant cell division was detected (Fig. 4A). On day 12 after transfer the 25⁺ RB^{low} population had expanded as much as the same population injected alone (Fig. 4A). In contrast, the RB^{high}

population in the coinjected animals showed a higher frequency (22%) of cells that were CFSE positive after 12 days compared with the ones isolated from hosts receiving RB^{high} T cells alone (3%; Fig. 4A). Moreover, at this time point the absolute number of RB^{high} T cells recovered from mice injected with this population alone was 10-fold higher than that in the mice coinjected with 25⁺ RB^{low} T cells. Interestingly, 6 days after transfer 60–80% of the 25⁺ CD4 T cells found in the spleen of the hosts had lost the CFSE staining, indicating that they had already gone through at least six or seven rounds of division. In contrast, at this time point >90% of the RB^{high} T cells did not divide more than once (Fig. 4B). The same result was observed when the two populations were independently injected (data not shown).

These experiments show that a fraction of 25⁺ RB^{low} T cells have a quite remarkable potential of expansion, and that by day 6 they were already engaged in cell division. In addition, they show that the homeostatic activity of 25⁺ RB^{low} on RB^{high} T cells operates shortly after transfer.

The expression of the CD25 molecule on CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T lymphocytes in vivo is not stable and is influenced by the presence of other CD4 T cells

The frequency of CD25⁺ T cells is constant throughout the adult life of normal mice (30), which led to the hypothesis that these

cells constitutively express this molecule (29, 31). Since T cells express high levels of CD25 upon activation (11), it was also suggested that CD25⁺ T cells are continuously activated *in vivo* (32). Here we analyzed whether the reconstitution of the CD25 compartment is dependent on the origin of the injected cells.

At sacrifice, the peripheral lymphoid organs of RAG-2^o animals injected with different CD4 T cell subsets, as shown in Figs. 1 and 2, were analyzed for the expression of CD25 on the recovered CD4 T cells as well. Interestingly, the frequency of lymph node T cells that stained positively for CD25 was similar in the recipients of 25⁺ and 25⁻ RB^{low} cells (Fig. 5). In the spleen, the frequency of CD25⁺ cells was 13.9% (SEM = 3.0; *n* = 8) within the group that received 25⁻ RB^{low} cells compared with 19.4% (\pm 1.1; *n* = 4) in the recipients of 25⁺ RB^{low} cells. The values observed were independent of the state of health of the mice. In contrast, transfers of naive RB^{high} cells reconstituted the CD25 compartment to a lower extent (in the spleen 5.6% (\pm 2.0); *n* = 5).

To assess whether the expression of CD25 on originally CD25⁺ cells is autonomously regulated within the population or requires the presence of other T cells in the recipient, we also analyzed the recipients coinjected with mixed CD4 T cell subsets, described in Fig. 2, for expression of the CD25 marker. Originally RB^{high} T cells showed similar frequencies of CD25-expressing cells in mesenteric lymph nodes regardless of the presence of other T cells in the injected recipients (5.8% (\pm 1.2; *n* = 7) in the presence of 25⁻ RB^{low} cells and 8.5% (\pm 3.0; *n* = 6) in the presence of 25⁺ RB^{low} T cells). The frequency of CD25-expressing cells in the originally 25⁻ RB^{low} population was modestly increased by the presence of RB^{high} cells in mesenteric lymph nodes, but was within the same range as in animals injected with 25⁻ RB^{low} cells alone (25⁻ RB^{low} alone, 18.9% (\pm 2.0; *n* = 8); 25⁻ RB^{low} in coinjections, 22.5% (\pm 3.2; *n* = 7); Fig. 5). In the presence of RB^{high} cells, the donor CD25⁺ population consisted mostly of CD25⁺ cells in the mesenteric lymph nodes (70.3% (\pm 3.6; *n* = 6) compared with 21.9% (\pm 4.1; *n* = 4) in recipients of CD25⁺ cells alone). These findings were similar in spleen and pooled axillary and inguinal lymph nodes.

We conclude that for the majority of transferred CD25⁺ CD4 T cells, the expression of the CD25 molecule requires the presence of other CD4 T cells. In addition, the 25⁻ RB^{low} population can generate higher frequencies of CD25⁺ cells than RB^{high} T cells upon transfer.

CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells from IL-10^o mice cannot efficiently regulate peripheral CD4 T cell numbers

Administration of rIL-10 leads to decreased numbers of splenic T cells recovered from mice injected with RB^{high} cells (17), and IL-10^o mice develop, apart from IBD, splenomegaly (33). Given these data, we hypothesized that IL-10 plays a role not only in the protection from disease, but also in regulation of the expansion of CD4 T cells. Earlier studies have shown that IL-10^o mice at 6 wk of age contain normal numbers of thymocytes and splenic T cells (19). To confirm and extend these findings, we analyzed the thymus, spleen, lymph nodes, blood, and intestine of 6-wk-old IL-10^o and wild-type (wt) mice for CD4 and CD8 T cells. Indeed, IL-10^o T cells were indistinguishable from wt mice with regard to numbers and expression of CD45RB, CD25, CD38, CD69, and CD44, including the presence of CD25⁺ CD4⁺ CD8⁻ thymocytes (data not shown), suggesting that the development of both CD4 and CD8 T cells is not strongly affected by the lack of IL-10.

To address the question of whether IL-10 is necessary for efficient control of the size of the activated T cell pool, we performed the same transfer experiments described above with donor cells from healthy IL-10^o mice bred onto the C57BL/6 background. Transfer of 3×10^5 sorted RB^{high} or 25⁻ RB^{low} cells from IL-10^o donors induced wasting in all RAG-2^o recipients, suggesting that the regulatory T cells in the 25⁻ RB^{low} population are IL-10 dependent. The wasting in mice injected with IL-10^o 25⁻ RB^{low} cells developed somewhat faster than that in hosts of IL-10^o RB^{high} T cells (Fig. 6A). Both populations expanded to a similar level (Figs. 6C and 1D), with a comparable organ distribution of the recovered T cells (Table III) as the corresponding populations from wt animals.

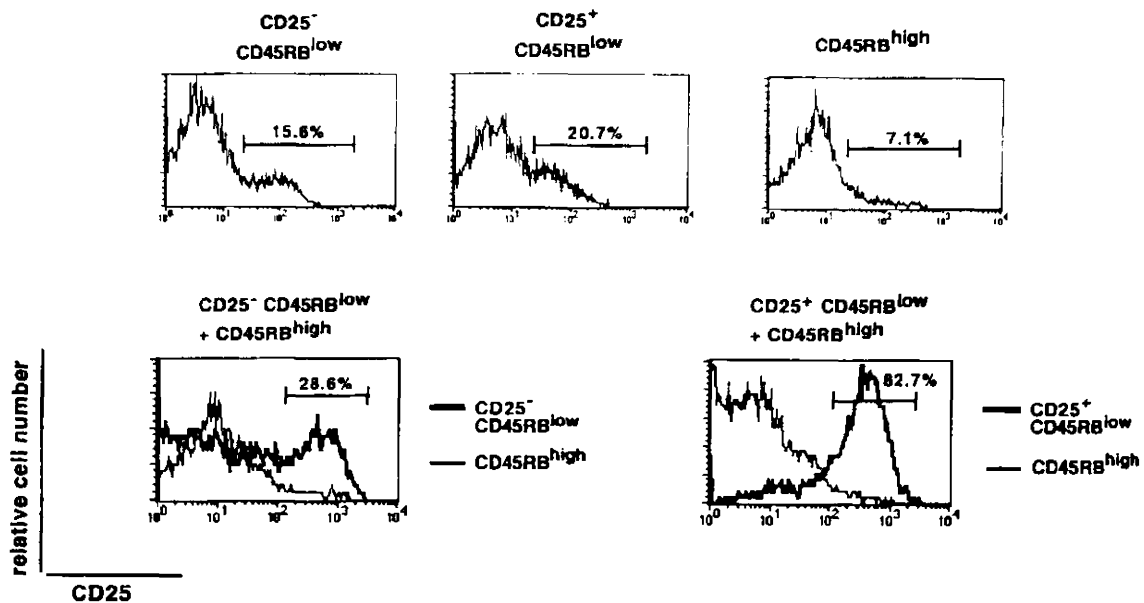


FIGURE 5. Frequency of CD25-expressing cells in recipients of distinct CD4 T cell subpopulations. At sacrifice, the mice described in Figs. 1 and 2 were analyzed for expression of CD25. Flow cytometric analysis for the expression of CD25 on gated donor CD4⁺ cells from mesenteric lymph nodes in the indicated groups of recipients is shown. CD4⁺ cells from different origins were identified by the expression of different Ly5 isoforms. Analysis of spleen and that of pooled axillary and inguinal lymph nodes yielded similar profiles.

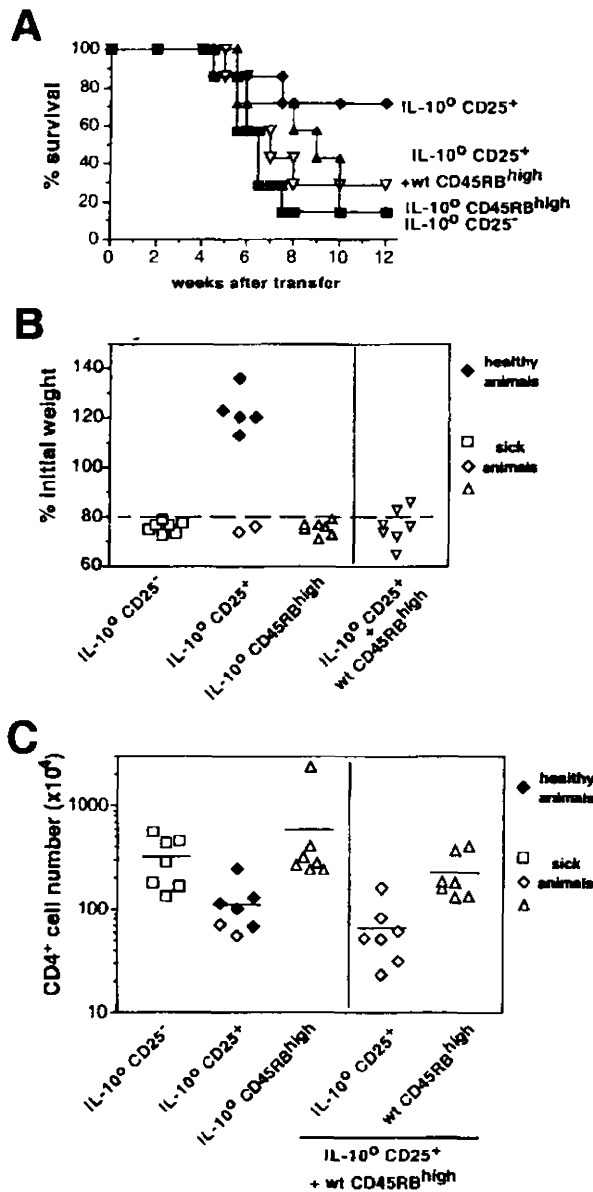


FIGURE 6. IL-10⁰CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells do not efficiently regulate peripheral CD4 T cell numbers. C57BL/6 RAG-2⁰ recipients were independently injected with 3×10^5 sorted CD4⁺ cell subsets from IL-10⁰C57BL/6 donors as described in Fig. 1. As indicated, another group of recipients was injected with 3×10^5 CD25⁺ T cells together with 3×10^5 wt CD45RB^{high} T cells. CD25⁺ and CD25⁻ CD4 cells were sorted from the CD45RB^{low} population. *A*, The time point of sacrifice for each recipient (seven recipients per group), either 12–14 wk after transfer or when they lost at least 20% of their original weight. *B*, Body weight of the recipients at the time of sacrifice. Sick animals were defined by weight loss below their initial weight, which was associated with diarrhea and a markedly enlarged colon. *C*, Sum of the number of CD4⁺ cells in spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; blood (assuming 3 ml of blood per animal); and intestine. Differentiation of the origin of the cells in coinjected recipients was achieved by using Ly5.1 congenic markers. The data are pooled from two or three independent experiments per group.

In the group of mice transferred with 3×10^5 IL-10⁰ 25⁺ RB^{low} cells, five of seven animals remained healthy for 12–14 wk (Fig. 6*B*). From these mice, on the average, 1.1×10^6 CD4 T cells could be recovered, representing 3-fold more than from animals that received wt 25⁺ T cells ($p < 0.02$; Figs. 6*C* and 1*D*). This was

largely due to increased cell numbers in spleen and blood of the recipients (Table III), and IL-10⁰ 25⁺ RB^{low} cells were found in the intestine only in very low numbers. The difference in cell recovery was not due to an increased survival of IL-10⁰CD4 T cells, since similar numbers were obtained 2 days after transfer into RAG-2⁰ recipients compared with the corresponding wt population (data not shown). Furthermore, the frequency of CD25-expressing cells among the recovered IL-10⁰CD4 T cells was for all populations indistinguishable from that of the corresponding wt CD4 T cells (data not shown).

Consistent with previous results (22), when 3×10^5 IL-10⁰ 25⁺ RB^{low} cells were injected together with 3×10^5 wt RB^{high} cells, the IL-10⁰CD25⁺ T cells could not prevent wasting in the RAG-2⁰ hosts (Fig. 6, *A* and *B*). The numbers of cells recovered from mice coinjected with IL-10⁰ 25⁺ RB^{low} T cells and wt RB^{high} cells were not significantly different from those recovered from recipients of either population alone (Figs. 6*C* and 1*D*). Interestingly, the expression of CD25 as well as the organ distribution of the coinjected populations were very similar to those in the recipients of wt T cells (data not shown and Table III).

As shown above, regulation of the peripheral expansion of RB^{high} by 25⁺ RB^{low} cells was already effective by 12 days after transfer. We ascertained the lack of regulatory activity of IL-10⁰ T cells by coinjecting normal CD25⁻ cells with IL-10⁰CD25⁺ T cells at different ratios into RAG-2⁰ recipients. As shown in Fig. 7, IL-10⁰, but not wt CD25⁺, cells showed a complete absence of regulatory effect on the expansion of CD25-depleted CD4 T cells. Even at a ratio of six IL-10⁰CD25⁺ T cells to one wt CD25⁻ cells, no signs of inhibitory activity were detected.

Taken together, the data demonstrate that 25⁺ RB^{low} cells from IL-10⁰ mice are unable to control the accumulation of peripheral CD4 T cells. Moreover, it was shown previously that normal animals contain potentially harmful T cells in the CD45RB^{low} population (10). Thus, although it is possible that IL-10⁰ animals contain higher frequencies of potentially disease-inducing activated CD4 T cells, the data allow the possibility that the disease inhibitory activity of 25⁻ RB^{low} T cells is also IL-10 dependent.

Discussion

Regulatory T cells protect from autoimmune diseases and IBD. Also, T cells contained in the CD45RB^{low} CD4 population control the size of the peripheral CD4 T cell compartment (10). In the present study we characterize two different subpopulations of CD4 T cells in their capacity to both prevent T cell-induced wasting disease and control peripheral CD4 T cell homeostasis. We show, first, that CD25⁺ CD45RB^{low} CD4 T cells, which prevent the onset of wasting, contribute to the regulation of peripheral T cell numbers. In contrast, CD25⁻ CD45RB^{low} CD4 T cells, which also prevent wasting, do not contribute significantly to the regulation of CD4 T cell homeostasis.

We conclude that control of CD4 T cell peripheral expansion and disease prevention are largely independent processes. Furthermore, we show that the mechanism underlying the regulation of the size of the peripheral T cell compartment is IL-10 dependent. Our results also provide the first description of the population dynamics of CD25⁺ T cells upon *in vivo* transfer. They establish that although CD25⁺ T cells reach a homeostatic equilibrium at low cell numbers, a fraction of these cells has a high potential of expansion.

CD25⁺ CD4 T cells were described to contain regulatory CD4 T cells in several experimental systems, including the one used here (2, 3, 12, 23, 30, 34). However, there is increasing evidence that regulatory CD4 T cells exist in the CD25⁻ compartment as well (35, 36). Our data showing the capacity of the CD25⁻

Table III. Organ distribution of CD4⁺ cells in RAG-2^o mice reconstituted with CD4 subpopulations from IL-10^o donors^a

Coinjected Populations	Phenotype of Injected CD4 ⁺ Subpopulations	No. of Animals	No. of Recovered CD4 ⁺ Cells ($\times 10^4$) ^b			
			Spleen	Lymph Nodes ^c	Blood ^d	Intestine
	IL-10 ^o CD25 ⁻ CD45RB ^{low}	7	138.0 (± 49.6)	24.5 (± 6.3)	27.4 (± 9.8)	79.6 (± 36.2)
	IL-10 ^o CD25 ⁺ CD45RB ^{low}	7	78.0 (± 23.5)	8.8 (± 2.5)	8.1 (± 2.2)	1.5 (± 0.3)
	IL-10 ^o CD45RB ^{high}	7	102.2 (± 13.5)	39.7 (± 8.3)	34.4 (± 2.7)	60.3 (± 14.1) ^e
IL-10 ^o CD25 ⁺ + wt CD45RB ^{high}	IL-10 ^o CD25 ⁺ CD45RB ^{low}	7	41.0 (± 12.8)	19.8 (± 6.3)	1.3 (± 0.2)	1.9 (± 1.4)
	wt CD45RB ^{high}		85.3 (± 36.8)	30.4 (± 7.3)	20.9 (± 5.4)	48.1 (± 21.7)

^a RAG-2^o recipients were injected with 3×10^5 FACS-sorted CD4 T cells from IL-10^o donors. In addition, 3×10^5 IL-10^o CD25⁺ CD4 T cells were also injected with 3×10^5 wt CD45RB^{high} CD4 T cells. Differentiation of the origin of the cells was achieved by using Ly5-congenic donors. The animals were analyzed for the presence of CD4⁺ cells in the indicated organs after 12–14 wk or when they dropped below 80% of their starting weight.

^b Average \pm SEM.

^c Axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes.

^d Data are expressed as cell number per milliliter of blood.

^e $n = 6$; one animal, excluded from these data, contained more than 2000×10^4 CD4⁺ cells in the intestine. Including this animal results in an average CD4⁺ cell number of $352.1 (\pm 292) \times 10^4$ in the intestine in this group.

CD45RB^{low} CD4 T cells to protect from wasting disease are well in line with a recent report (23) in which a similar reduction in the incidence of CD4 T cell-induced IBD was observed at a comparable CD25⁻/RB^{high} T cell ratio.

This observation raises the question of the relationship between CD25⁺ and CD25⁻ regulatory CD4 T cells. At this point we cannot exclude that the two subsets differ in their development, function, and/or specificity, although this is not very likely. First, the expression of CD25 on different CD4 T cell subsets is not stable after transfer into alymphoid hosts, and in the case of CD25⁺ T cells it is dependent on the presence of other CD4 T cells. It is thus possible that in normal animals CD25 expression is dynamic and, therefore, the marker is not identifying the entire pool of regulatory T cells. Secondly, both CD25⁺ and CD25⁻ regulatory T cells depend on IL-10 for efficient disease protection. Furthermore, CD25⁻ regulatory T cells do not compensate for a block of the function of CD25⁺ regulatory T cells when the protective activity of total CD45RB^{low} T cells is inhibited by anti-TGF- β or anti-CTLA-4 Ab treatment (20, 23).

The dissociation between protection of disease and systemic (and local) regulation of CD4 T cell numbers observed in our studies indicates that both processes are to a large extent independently regulated. This may be the result of a quantitative difference in the number of regulatory CD4 T cells required to control both processes. Disease protection may require lower numbers of regulatory T cells and/or rely on the presence of appropriate TCR specificities in the pool of regulatory T cells. Thus, it can be effective even in the absence of efficient growth control. The lack of appropriate specificities would also explain why the CD25⁺ CD4 population did not confer protection from wasting in some cases, while showing a quite efficient growth inhibitory activity on other CD4 T cells in the sick recipients. Similar observations were described in other systems: tolerance can be ensured when T cells expand (37), and differentiation can take place in the absence of overt proliferation of T cells (38, 39).

Taken together, it is possible that regulatory CD25⁻ T cells are descendants of thymic regulatory CD25⁺ T cells (34, 35) and represent an alternative state of the same functional pool of peripheral regulatory T cells. CD25⁺ CD4 T cells might be enriched for regulatory T cells simply because they are activated (effector state), but regulatory T cells might become CD25⁻ T cells in the absence of the appropriate stimuli (memory state).

In contrast to our previous report (10), we could now recover sizable numbers of CD4 T cells from the intestines of healthy recipients. Moreover, similar numbers of intestinal T cells were observed between healthy and sick recipients within the same ex-

perimental group. However, this appears to represent a different organ distribution of the cells rather than a higher level of T cell expansion, because the differences in total cell numbers from recipients of CD45RB^{low} T cells compared with recipients of CD45RB^{high} T cells was in this study very similar to what we reported previously. This argues for a systemic regulation of peripheral CD4 T cell numbers and not for a compartmentalized control in individual organs. The increased frequency of intestinal CD4 T cells reported here could perhaps reflect a subclinical state of inflammation in these overall healthy mice due to an unbalanced ratio of regulatory to target CD4 T cells. Nevertheless, a >3-fold reduction in the number of intestinal T cells belonging to the transferred CD45RB^{high} CD4 T cell population was observed in coinjections with the CD25⁺ CD45RB^{low} T cells. This is consistent with our previous report, namely that regulatory CD4 T cells inhibit the accumulation of CD4 T cells in the intestine. The observation that similar T cell numbers are scored in the intestines of sick and healthy animals reinforces the conclusion that T cell expansion and incidence of disease are not directly linked.

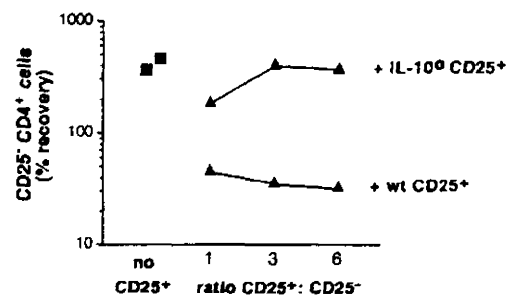


FIGURE 7. High numbers of IL-10^oCD25⁺ CD4 T cells do not show growth inhibitory activity. CD4 T cells from wt or IL-10^o donors were separated by two consecutive rounds of magnetic bead purification into CD25⁺ and CD25⁻ subsets. CD25⁻ CD4 T cells (9×10^5 ; <1% CD25⁺ cells) from wt animals were then injected into RAG-2^o hosts, either alone or together with wt CD25⁺ (>93% pure) or IL-10^oCD25⁺ CD4 T cells (>92% pure) at the indicated ratios. Eleven days after transfer the recipients were analyzed for CD4⁺ cells in spleen; axillary, inguinal, and mesenteric lymph nodes; blood (assuming 3 ml of blood per animal); and intestine. The resulting numbers are expressed as a percentage of the injected cell numbers. The symbols show individual mice from the same experiment. ■, wt CD25⁻ CD4 T cells injected alone; ▲, CD25⁻ CD4 T cells injected with the indicated CD25⁺ CD4 T cell population. Differentiation of the origin of the cells was achieved using Thy1.1 and/or Ly5.1 congenic markers.

Our studies also assessed the proliferative potential and the homeostatic equilibrium of peripheral CD25⁺ CD4 T cells. The idea has been that regulatory T cells have a limited capacity of expansion, perhaps as a result of their own growth inhibitory activity. This is in line with the inability of these cells to proliferate in vitro upon stimulation unless exogenous IL-2 is added. Here we provide evidence that a fraction of CD25⁺ CD45RB^{low} cells is capable of considerable in vivo proliferation despite the fact that the population reaches a homeostatic equilibrium at low cell numbers. The present data do not provide information on the rate of apoptosis occurring after each round of division, but extensive apoptosis during the expansion process will only increase the number of cell divisions required to account for the observed cell numbers.

The reasons why the homeostatic equilibrium of CD25⁺ CD45RB^{low} T cells is reached at low cell numbers are nevertheless unclear at this point. It could be that these cells are driven and/or regulated by different growth factors or have limited functional niches compared with the other CD4 T cell populations.

Asseman et al. (22) demonstrated that the IBD protective function of regulatory CD4 T cells is IL-10 dependent. The lack of efficient growth inhibitory activity of CD25⁺ T cells from IL-10^o mice reveals a role for this IL in peripheral T cell homeostasis. In the results presented here CD25⁺ T cells from IL-10^o mice showed many characteristics of wt CD25⁺ CD4 T cells, and most recipients of IL-10^oCD25⁺ T cells remained healthy, although this subset contained potentially aggressive T cells. This suggests that the CD25⁺ pool of IL-10^oCD4 T cells, although not homogeneous, is highly enriched for cells of the regulatory lineage, which, in the absence of IL-10, have a higher potential of expansion.

Other groups reported a linkage between the susceptibility to autoimmune diseases and the balance between IL-12 and IL-10 as well as a role for IL-12 in CD4 T cell expansion (40, 41). It is thus possible to envisage that IL-10 produced by regulatory T cells leads to down-regulation of IL-12 production by APC, resulting in decreased levels of IL-2 and, in turn, restricted CD4 T cell expansion. Our data show that regulatory CD25⁺ T cells prevent extensive T cell expansion and do not seem to interfere significantly with the activation of naive T cells in the recipient.

The onset of IBD and splenomegaly in IL-10^o mice occurs relatively late in life compared with other situations in which deregulation of peripheral T cell homeostasis is already apparent 3–4 wk after birth. This strongly suggests that factors other than IL-10 are involved in the regulation of peripheral T cell numbers. Indeed, spontaneous autoimmune disease and disruption of T cell homeostasis were recently described in mice transgenic for a T cell-targeted dominant negative TGF- β receptor (42, 43). It is worth pointing out, however, that whatever the cellular interactions or mechanisms that delay the development of disease in IL-10^o mice, they are disrupted in the transfer experiments presented here. Thus, further studies are needed to dissect the dependence of T cell homeostasis from cytokines produced by regulatory T cells.

Acknowledgments

We thank Dr. Pablo Pereira and all the members of the Unité du Développement des Lymphocytes for helpful comments and suggestions, Jocelyne Alexandre and No l Aimar for excellent animal care, and Anne Louise for cell sorting.

References

- Saoudi, A., B. Seidman, D. Fowell, and D. Mason. 1996. The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *J. Exp. Med.* 184:2393.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). *J. Immunol.* 155:1151.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184:387.
- Olivares-Villagomez, D., Y. Wang, and J. J. Lafaille. 1998. Regulatory CD4⁺ T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 188:1883.
- Van de Keere, F., and S. Tonegawa. 1998. CD4⁺ T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 188:1875.
- Rueff-Juy, D., M. Faure, A.-M. Drapier, and P.-A. Cazenave. 1998. Role of maternal Ig in the induction of Ck-specific CD8⁺ T cell tolerance. *J. Immunol.* 161:721.
- Morrissey, P. J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, and J. D. Watson. 1993. CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice: disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 178:237.
- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. Barcomb Caddle, and R. L. Coffman. 1993. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 5:1461.
- Modigliani, Y., V. Thomas-Vaslin, A. Bandeira, M. Coltey, N. M. Le Douarin, A. Coutinho, and J. Salaun. 1995. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7555.
- Anacker, O., O. Burlen-Defranoux, R. Pimenta-Araujo, A. Cumano, and A. Bandeira. 2000. Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J. Immunol.* 164:3573.
- Nelson, B. H., and D. M. Willerford. 1998. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.* 70:1.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 163:5211.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Ueda, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303.
- Wallace, V. A., W. P. Fung-Lung, E. Timms, D. Gray, K. Kishihara, D. Y. Loh, J. Penninger, and T. W. Mak. 1992. CD45RA and CD45RB^{high} expression induced by thymic selection events. *J. Exp. Med.* 176:1657.
- Lee, W. T., X.-M. Yin, and E. S. Vitetta. 1990. Functional and ontogenetic analysis of murine CD45R^{hi} and CD45R^{lo} CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 144:3288.
- Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1994. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 179:589.
- Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L. Barcomb Caddle, and R. L. Coffman. 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45R^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1:553.
- Thoma, S., K. Bonhagen, D. Vestweber, A. Hamann, and J. Reimann. 1998. Expression of selectin-binding epitopes and cytokines by CD4⁺ T cells repopulating scid mice with colitis. *Eur. J. Immunol.* 28:1785.
- K hn, R., J. L hler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. M ller. 1993. Interleukin 10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263.
- Powrie, F., J. Carlino, M. W. Leach, S. Mauze, and R. L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor- β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 183:2669.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737.
- Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190:995.
- Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192:295.
- Freitas, A. A., and B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the fight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 18:83.
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. P rarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057.
- Tanchot, C., and B. Rocha. 1995. The peripheral T cells repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cell pools. *Eur. J. Immunol.* 25:2127.
- Lyons, A. B., and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171:131.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10:1969.
- Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188:287.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, R. McHugh, K. Natarajan, H. Margulies, and E. M. Shevach. 1999. Post-thymectomy autoimmune gastritis: fine specificity and pathogenicity of anti-H/K ATPase-reactive T cells. *Eur. J. Immunol.* 29:669.

31. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431.
32. Kuniyasu, Y., T. Takahashi, M. Itoh, J. Shimizu, G. Toda, and S. Sakaguchi. 2000. Naturally anergic and suppressive CD25⁺CD4⁺ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* 12:1145.
33. Rennick, D. M., M. M. Fort, and N. J. Davidson. 1997. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *J. Leukocyte Biol.* 61:389.
34. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 162:5317.
35. Stephens, L. A., and D. Mason. 2000. CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J. Immunol.* 165:3105.
36. Olivares-Villagomez, D., A. K. Wensky, Y. Wang, and J. J. Lafaille. 2000. Repertoire requirements of CD4⁺ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 164:5499.
37. Adler, A. J., C.-T. Huang, G. S. Yochum, D. W. Marsh, and D. M. Pardoll. 2000. In vivo CD4⁺ T cell tolerance induction versus priming is independent of the rate and number of cell divisions. *J. Immunol.* 164:649.
38. Malvey, E.-N., M. K. Jenkins, and D. L. Mueller. 1998. Peripheral immune tolerance blocks clonal expansion but fails to prevent the differentiation of Th1 cells. *J. Immunol.* 161:2168.
39. Laouar, Y., and I. N. Crispe. 2000. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4⁺ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* 13:291.
40. Segal, B. M., B. K. Dwyer, and E. M. Shevach. 1998. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 187:537.
41. Davidson, N. J., S. A. Hudak, R. E. Lesley, S. Menon, M. W. Leach, and D. M. Rennick. 1998. IL-12, but not IFN- γ , plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* 161:3143.
42. Gorelik, L., and R. A. Flavell. 2000. Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12:171.
43. Lucas, P. J., S.-J. Kim, S. J. Melby, and R. E. Gress. 2000. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor β II receptor. *J. Exp. Med.* 191:1187.