



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

**IMUNO-REGULAÇÃO POR CITOCINAS NA
TUBERCULOSE PULMONAR
AVALIAÇÃO PELA TÉCNICA DE SANGUE TOTAL.**

EDVANA DOS SANTOS FERREIRA

**Salvador - Bahia - Brasil
1999**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

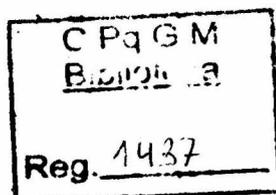
**IMUNO-REGULAÇÃO POR CITOCINAS NA
TUBERCULOSE PULMONAR.
AVALIAÇÃO PELA TÉCNICA DE SANGUE TOTAL.**

EDVANA DOS SANTOS FERREIRA

Orientador: MANOEL BARRAL-NETTO

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia, área de
concentração em Patologia
Experimental.

Salvador - Bahia, 1999



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F383i Ferreira, Edvana dos Santos
Immuno-regulação por citocinas na tuberculose pulmonar /
Edvana dos Santos Ferreira. _ Salvador: UFBA / CPqGM, 1998.
67p.:il.

Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da
Bahia, 1998.

1. Tuberculose pulmonar. 2. Citocinas. I. Título.

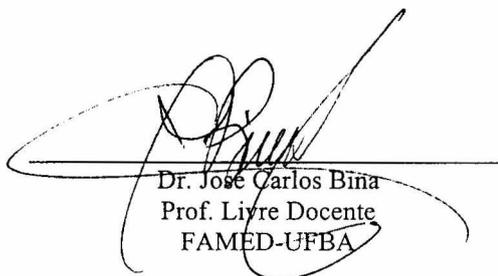
CDU 616.24-002.5:577.2

616.24-002.5:577.2

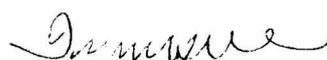
F383i

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Carlos Bina
Prof. Livre Docente
FAMED-UFBA



Dr. Dumith Bou-Habib
Pesquisador Associado
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Manoel Barral-Netto
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

“No caminho da sabedoria te ensino, e pelas carreiras te faço andar”

Provérbios, 4:11

“O homem sábio é forte e o homem de conhecimento aumenta a força”.

Provérbios, 24:5

A DEUS, por sempre indicar o caminho certo a seguir,

***A minha mãe por me acompanhar em todos os momentos e acreditar sempre
que eu posso vencer,***

Ao Renato, meu amor e companheiro, pela força e compreensão,

A meu irmão e família que sempre estiveram juntos na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Manoel Barral-Netto pela excelente orientação e por mostrar através de sua simplicidade quão magnânimo pode ser o homem.

Ao Dr. Sérgio Arruda pela co-orientação nos trabalhos desenvolvidos e co-orientação na escrita da dissertação.

Ao Dr. Marcelo Chalhoub pela avaliação clínica dos pacientes.

A Dr. Marcus Andrade de Paula, companheiro de coletas, sempre mostrando interesse incessável no que fazia e com muita competência.

A Silvia Andrade Cardoso pela minha iniciação nas técnicas laboratoriais dessa pesquisa .

A Cristiane Nascimento e a Theolis Barbosa pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais e na discussão científica.

A Elane Amorim do HUPES que realizou as avaliações hematológicas dos pacientes.

A Jorge Tolentino pela paciência dedicada sempre que solicitado por mim no laboratório.

Ao pessoal da biblioteca pelo auxílio e orientações recebidas durante a obtenção de artigos científicos e correção da bibliografia.

Aos professores que mais se tornaram amigos durante este tempo.

Aos colegas dos setores de audio visual e de informática do CPqGM pelos auxílios prestados.

Aos pacientes, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

A Ana Fiscina, pela colaboração nas referências bibliográficas.

A Rosália Meire, por ser uma profissional brilhante na secretaria da pós-graduação e muitas vezes mãe, amiga, confidente.

A todos do CPqGM, HUPES, UCSal e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse experimento e que não foram aqui citados, meu sinceros agradecimentos.

Ao CPqGM pela concessão da bolsa de estudo e pelas condições gerais para o desenvolvimento dos trabalhos.

WHO pelo fornecimento de kits para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	1
1.2	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA TUBERCULOSE PULMONAR	4
1.3	ESTÁGIOS CLÍNICOS DA TUBERCULOSE PULMONAR	6
1.4	IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE	8
1.4.1	Papel do macrófago	8
1.4.2	Papel dos linfócitos CD4	10
1.4.3	Linfócitos T	11
1.4.4	Regulação da resposta imune em pacientes com tuberculose	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	JUSTIFICATIVA	17
4	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	PACIENTES	20
4.2	MÉTODOS	21
4.2.1	Reagentes e estimulação	21
4.2.2	Avaliação da produção de citocinas	22
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO	41
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
9	ANEXOS	48

LISTAS DE ABREVIATURAS

M.tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATS	Sociedade Torácica Americana
IL	Interleucina
DTH	Hipersensibilidade Tardia
BAL	Lavado Broncoalveolar
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IFN	Interferon
NK	Célula Matadora Natural
LAM	Lipoarabinomanana
PPD	Derivado de Proteína Purificada
Mφ	Macrófago
BCG	Bacilo Calmett-Guérin
ELISA	Ensaio imuno – enzimático
TGF	Fator de transformação do crescimento
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago
hsp	Proteína de estresse pelo calor
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade

RESUMO

IMUNO-REGULAÇÃO POR CITOCINAS NA TUBERCULOSE PULMONAR HUMANA. AVALIAÇÃO PELA TÉCNICA DE SANGUE TOTAL. Edvana Ferreira.[**INTRODUÇÃO**]. A tuberculose continua sendo um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, por este motivo, é preciso desenvolver estudos para o entendimento da resposta imune associada à proteção ou à imunopatologia desta doença. Alguns relatos demonstram que manifestações clínicas da tuberculose se correlacionam com a produção de citocinas. O IFN- γ tem sido implicado na proteção contra o *M. tuberculosis*, enquanto citocinas deativadoras de macrófagos como IL-10, se correlacionam com a progressão da doença. O TNF- α pode participar da gênese das lesões teciduais. Contudo, esta visão parece simplificada, e é necessário avaliar os níveis destas citocinas em grupos de pacientes bem caracterizados para validar clinicamente esta hipótese. [**OBJETIVO**]. Avaliar o perfil de IFN- γ , IL-10 e TNF- α , produzido pelas células do sangue total de pacientes em diferentes estágios da tuberculose pulmonar, em resposta ao PPD e ao antígeno total do *Mycobacterium tuberculosis*. [**PACIENTES E MÉTODOS**]. Vinte e dois pacientes com tuberculose pulmonar em diferentes estágios de evolução (mínima,n=7; moderada,n=8; avançada,n=7 segundo a classificação da American Thoracic Society) foram incluídos neste estudo. Sangue total heparinizado destes indivíduos foi colhido e posteriormente diluído (1:10) em RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e gentamicina e aliqotados em 1 ml por poço. As culturas foram estimuladas com 20 $\mu\text{g/ml}$ de PPD, 5 $\mu\text{g/ml}$ de filtrado de cultura do *M. tuberculosis* ou mantidas em cultivo na ausência de antígeno. O sobrenadante foi colhido após 72 horas de incubação. Todas as amostras foram avaliadas por teste de ELISA Sandwich para dosagem de IFN- γ (Endogen, MA), IL-10 (Genzyme,MA) e TNF- α (Genzyme,MA). [**RESULTADOS**]. Existe uma correlação negativa entre os níveis de IFN- γ nos estágios clínicos da tuberculose, ao contrário os níveis de TNF- α e IL-10 apresentam correlação positiva e significativa com os estágios mais avançados da tuberculose pulmonar. A produção de IFN- γ em resposta ao estímulo de PPD *in vitro* foi de 861 pg/ml no estágio mínimo, 255 pg/ml no estágio moderado e 56 pg/ml no estágio avançado; a produção de TNF- α com o estímulo de PPD foi de 30 pg/ml para o estágio mínimo, 70 pg/ml para o estágio moderado e 68 pg/ml para o estágio avançado; e a IL-10 estimulada com PPD apresentou 19 pg/ml para o estágio mínimo, 16 pg/ml para o estágio moderado e 38 pg/ml para o estágio avançado. [**CONCLUSÕES**]: Há um predomínio de diferentes citocinas nos estágios mínimo, moderado e avançado da tuberculose pulmonar. No estágio mínimo predomina IFN- γ e no estágio avançado, há um predomínio de TNF- α e IL-10. Os resultados reforçam que IL-10 e TNF- α estão associados com progressão da doença.

ABSTRACT**IMMUNOREGULATION OF HUMAN PULMONARY TUBERCULOSIS BY CYTOKINES. EVALUATION BY WHOLE BLOOD TECHNIQUE. Edvana Ferreira.**

[INTRODUCTION] Tuberculosis is an important public health problem worldwide and an increasing problem in Brazil. There are important obscure points in the pathogenesis of human tuberculosis which need to be addressed. Protection against tuberculosis is ascribed to cell-mediated immunity, and IFN- γ is the major cytokine involved in macrophage activation and mycobacteria destruction. IL-10, and other macrophage deactivating cytokines, are implicated in disease progression. TNF- α has been shown to be important for macrophage activation, but it is also implicated in tissue destruction. The relationship of the different phases of human tuberculosis to the production of such cytokines is not known in well characterized patients. **[OBJECTIVE]** To evaluate the profile of IFN- γ , IL-10 and TNF- α produced in response to PPD or crude *M. tuberculosis* antigen in the whole blood from patients with pulmonary tuberculosis at minimal, moderate or advanced phases of the disease. **[PATIENTS, MATERIAL AND METHODS]** Twenty-two patients with pulmonary tuberculosis (minimal, n=7; moderate, n=8; advanced, n=7) were included in this study. Disease was diagnosed by clinical and laboratory (culture, sputum smear and chest X - ray) data. Disease extension followed the recommendations of the American Thoracic Society. Heparinized whole blood was diluted 1:10 with RPMI 1640 containing L-glutamine and gentamicin. One ml of diluted blood (1ml per well in 24-well plates), were left unstimulated, or stimulated with PPD (20 μ g/ml) or *M. tuberculosis* antigen (5 μ g/ml). Cultures were incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5%CO₂, and cell-free supernatants were collected after 72h. Cytokines were measured using commercial reagents in a sandwich ELISA for IFN- γ (Endogen, MA), IL-10 (Genzyme, MA) and TNF- α (Genzyme, MA). **[RESULTS]:** There is negative correlation between the levels of IFN- γ and the extension of disease. Both, IL-10 and TNF- α correlated positively with the extension of disease. IFN- γ production in response to PPD was 861 pg/ml, in minimal disease, 255 pg/ml in moderate disease and 56 pg/ml in advanced. The levels of TNF- α were 30 pg/ml in minimal, 70 pg/ml in moderate and 68 pg/ml in advanced pulmonary tuberculosis. IL-10 was 19 pg/ml, 16 pg/ml and 38 pg/ml in minimal, moderate and advanced tuberculosis respectively. **[CONCLUSIONS]** There is a predominance of different cytokines during the different stages of disease. The presence of high amounts of TNF- α and IL-10 in patients with advanced disease reinforces in man the experimental data of association of these cytokines with disease progression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A Organização Mundial de Saúde (OMS) revela que 1,7 bilhão de indivíduos estão infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), o que significa que a cada três habitantes do planeta, um se encontra infectado (PARRISH *et al.*,1998). O agente causador da tuberculose humana tem sido o responsável pela morte de milhões de pessoas em todo mundo. No ano de 1997, cerca de 7,2 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose ativa. Deste total, 448.000 casos de tuberculose ocorreram nas Américas, com 160.000 mortes (DOLIN *et al.*,1994).

No Brasil, a tuberculose também é uma das doenças infecciosas mais prevalentes, apresentando altas morbidade e mortalidade. Cerca de 35 a 45 milhões de brasileiros estão infectados pelo *M. tuberculosis*, e aproximadamente 100.000 desenvolvem tuberculose a cada ano, sendo que 4.000 a 5.000 morrem (GERHARDT-FILHO *et al.*,1993). No Brasil, o risco de infecção é da ordem de 0,5%, nível intermediário entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Nos países desenvolvidos o risco de infecção igual ou inferior a 0,1%, enquanto nos países subdesenvolvidos estas cifras crescem para 2% a 2,5% ao ano (GERHARDT-FILHO *et al.*, 1993).

Um dos principais fatores que influi diretamente na prevalência da tuberculose, no Brasil e no mundo, é a situação sócio-econômica da população. Além da pobreza, a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) contribui enormemente para o aumento no número de casos da tuberculose (GERHARDT-FILHO *et al.*, 1993).

A associação da tuberculose com a pobreza ficou evidente com a diminuição

de casos desta doença à medida que os países se desenvolveram economicamente, a exemplo dos Estados Unidos e alguns países da Europa. Essas observações induziram as autoridades da área de saúde destes países a afirmarem que a tuberculose seria erradicada até o ano 2000, e isto desestimulou o desenvolvimento de novas vacinas e drogas necessárias para o controle da tuberculose.

A partir de 1982, o surgimento de casos de indivíduos infectados pelo HIV ou doentes com AIDS, afastou por definitivo as perspectivas de uma possível erradicação rápida da tuberculose, mesmo nos países ricos. Nos Estados Unidos, antes de 1982 e, portanto antes da epidemia da AIDS, o número de casos de tuberculose estava diminuindo em 5% a cada ano. Entre 1985 a 1992 ocorreu uma reversão e o número de casos de tuberculose aumentou em 20% (FENTON *et al.*, 1996).

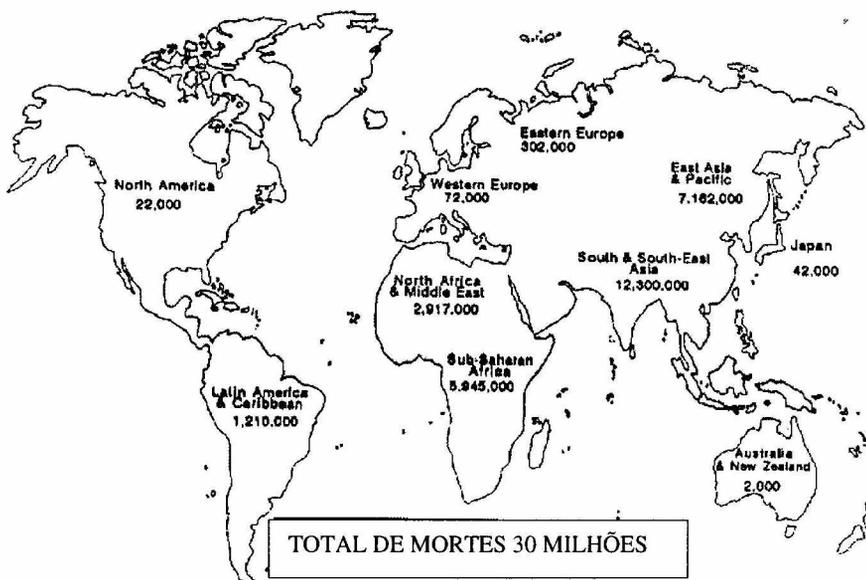
Segundo as projeções da OMS, os número de casos acumulados entre 1995 até o ano 2000, inicialmente previstos em 7,5 milhões de casos de tuberculose, sofrerá também acréscimo, sendo as projeções atuais de 10,2 milhões de casos. Com base nestes dados, são esperadas também cerca de 3,5 milhões de mortes por tuberculose até no ano 2000, cerca de 39% superior o número de mortes ocorridos no ano de 1990. Durante o período de dez anos, que abrange de 1990 a 1999, estima-se que 88 milhões de pessoas desenvolverão tuberculose (Quadro 1^A) e que 30 milhões de pessoas morrerão por tuberculose (Quadro 1B) (FENTON *et al.*, 1997; MURRAY *et al.*, 1997; DOLIN *et al.*, 1994).



QUADRO 1 A – Estimativa cumulativa mundial de casos de tuberculose no período de 1990 – 99.

LEGENDA

North America	América do Norte
Latin America	América Latina
Caribbean	Caribe
Eastern Europe	Europa Oriental
East Asia & Pacific	Ásia Oriental e Pacífico
North África & Middle East	África do Norte e Oriente Médio
Sub-Saharan African	Sub Saara
Japan	Japão
Austrália New Zeland	Austrália Nova Zelândia
South & East Asia	Ásia Sul e Oriental
Western Europe	Europa Ocidental



QUADRO 1B – Estimativa cumulativa mundial de mortes por tuberculose no período de 1990 – 99.

Os números citados são projeções, pois a interferência de vários fatores mencionados abaixo impedem a determinação precisa da epidemiologia da tuberculose no mundo (KOBZIK *et al.*, 1994).

- as notificações de casos de tuberculose são incompletas;
- apenas uma parcela de pessoas infectadas com *M. tuberculosis* manifesta a doença clínica em algum momento de suas vidas. Muitas destas pessoas permanecem com uma infecção assintomática, sendo reatores aos testes cutâneos com tuberculina, sem necessariamente desenvolverem a doença;
- todas as pessoas infectadas permanecem indefinidamente com risco de desenvolver a doença.

O grande número de infectados e doentes com tuberculose reforça a necessidade de novas vacinas e terapias para o controle da tuberculose no mundo. Pelo seu baixo custo geral, se comparado ao custo do tratamento, as vacinas são as únicas alternativas para o controle da tuberculose nos países pobres. Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra tuberculose, há necessidade de se conhecer os mecanismos protetores e imunopatológicos desta doença em seres humanos.

1.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA TUBERCULOSE PULMONAR

A forma pulmonar é a mais comum manifestação clínica da tuberculose, e decorre de uma reativação da infecção primária latente. A contenção de uma infecção latente depende da defesa imunológica dos indivíduos; no entanto, se houver uma diminuição da resposta imune celular, há uma reativação local podendo, por vezes, haver disseminação do bacilo para outros órgãos. Nos indivíduos adultos, as lesões tuberculosas ocorrem particularmente nos lobos superiores do pulmão, onde o nível de oxigênio é alto, o que favorece o crescimento bacilar.

A proliferação do bacilo no tecido pulmonar geralmente resulta em caseificação, necrose caseosa no centro da lesão, seguida da formação de material caseoso líquido, que é expectorado, resultando na formação de uma cavitação, que em seguida é preenchida por ar no seu interior. Os bacilos se multiplicam rapidamente na caverna e pode ocorrer disseminação para novas áreas do pulmão através dos brônquios. Com a cura formam-se áreas de fibrose (cicatriz tecidual) mas observa-se também um quadro misto, onde algumas lesões e fibrose são vistas ao lado de lesões ativas ocorrendo ao mesmo tempo. Após a fibrose, pode haver calcificações, que são comumente visualizadas nas radiografias de indivíduos curados de tuberculose. Estas lesões podem danificar as paredes brônquicas e produzir bronquiectasias, que é o alargamento acentuado dos brônquios (KOBZIK *et al.*,1994)

Os sinais e sintomas clínicos da tuberculose pulmonar são tão variados quanto as lesões anatômicas. A tuberculose primária é usualmente um processo silencioso. Em muitos casos, a infecção primária é detectada apenas pelo teste tuberculínico, ou detectado após muito tempo através de calcificações focais no parênquima pulmonar, que são nitidamente observadas nas radiografias. Ocasionalmente, a infecção primária pode causar febre e perda do apetite.

A tuberculose secundária inicia na parte apical ou no segmento posterior de um ou ambos os pulmões. Os pacientes que apresentam esta forma da doença tem febre , sudorese noturna, fadiga, anorexia e perda de peso, freqüentemente associado a tosse produtiva e algumas vezes a hemoptise.

O diagnóstico de tuberculose pulmonar pode ser confirmado pela demonstração do *M. tuberculosis* no escarro utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen ou pelo cultivo do bacilo em meio de cultura.

Estágios Clínicos da Tuberculose Pulmonar

As lesões da tuberculose tem padrão radiológico diverso assim como suas manifestações clínicas. Pela sua complexidade, nenhum sistema simples de classificação pode dar a descrição completa das lesões. No entanto, a extensão total e a localização da lesão pulmonar pode ser feita após avaliação radiológica do tórax, que é necessária para observar a distribuição, além de observar a presença ou ausência de cavitação pulmonar.

Segundo as normas da "American Thoracic Society" (ATS) (1981), a tuberculose pulmonar pode ser classificada de acordo com a extensão da doença em três estágios; mínima, moderada e avançada, as quais estão radiologicamente representados nas figuras a seguir.

A tuberculose mínima inclui lesão de densidade pequena a moderada mas sem cavitação aparente. Estas lesões podem envolver uma parte pequena de um ou ambos os pulmões, mas a extensão total e a distribuição não podem exceder o volume do pulmão em um lado. A lesão está presente acima da segunda junção condrocostal e da apófise espinhosa da quarta vértebra ou o corpo da quinta vértebra torácica. O termo "mínima" não pode ser interpretado como risco mínimo ou atividade mínima da doença neste estágio.

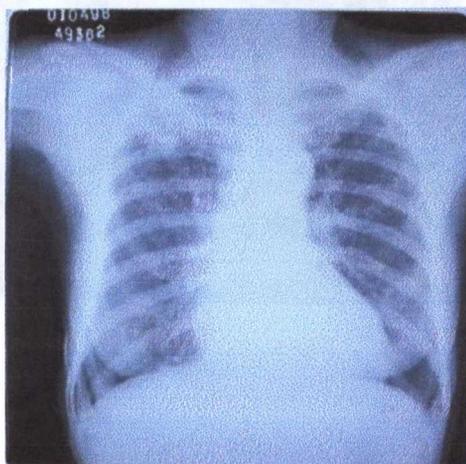


Foto 1: Estágio Mínimo

A tuberculose moderada apresenta uma lesão presente em um ou ambos os pulmões, mas a extensão total não excede os seguintes limites: lesão disseminada de pequena a moderada densidade que pode estender-se ao volume total de um pulmão ou o equivalente em ambos os pulmões. Lesão densa e confluyente que estão limitadas na extensão de um terço do volume de um pulmão. O diâmetro total da cavitação, se presente, deve ser menor que 4 cm.

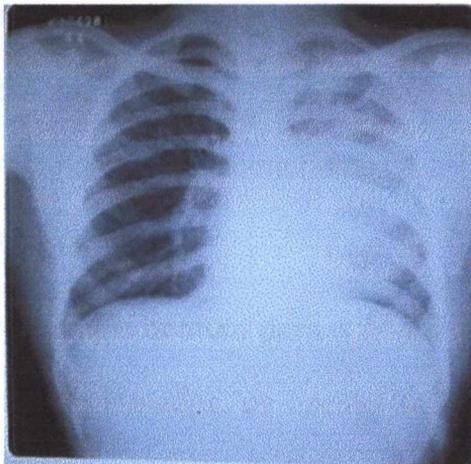


FOTO 2: ESTÁGIO MODERADO

A tuberculose avançada é caracterizada por apresentar lesões mais extensas que a moderada e apresenta cavitação maior que 4 cm .

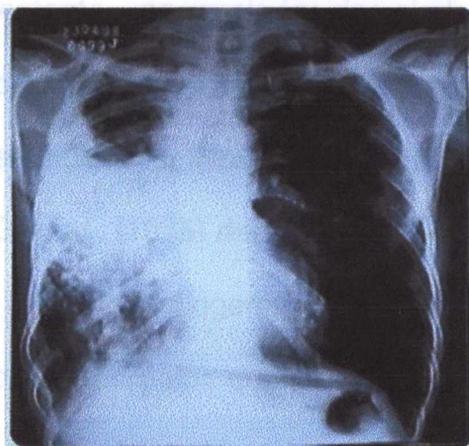


FOTO 3: ESTÁGIO AVANÇADO

1.4 IMUNOLOGIA DA TUBERCULOSE

O *M. tuberculosis* apresenta a capacidade de disseminar-se por vários órgãos e a ocorrência da propagação deste depende da habilidade ou não do hospedeiro em controlar a doença. Se o hospedeiro desenvolve uma resposta imune eficaz, a infecção é controlada. Caso a resposta imune seja ineficaz, a possibilidade de disseminação do bacilo é aumentada. Desta forma, pode-se entender que existem indivíduos capazes de manter controlado o bacilo, sugerindo que existe um mecanismo de proteção contra o *M. tuberculosis*, e por esse motivo torna-se imprescindível o estudo da resposta imunológica contra esta micobactéria .

1.4.1 Papel do macrófago

A via de entrada mais comum para o *M. tuberculosis* é o trato respiratório. Na infecção inicial, ao serem inalados, os bacilos se alojam nos alvéolos pulmonares e são fagocitados pelos macrófagos aí residentes. Após a fagocitose, parte dos bacilos é destruída pelos mecanismos microbicidas macrofágicos e outra parte permanece viva e se multiplica dentro dos fagolisossomas, ou escapam para o citoplasma. No entanto, na maioria dos indivíduos infectados, os bacilos permanecem em forma latente e estes não desenvolvem doença. Bacilos não fagocitados podem se multiplicar livremente na cavidade alveolar.

ARMSTRONG *et al.*, (1975) demonstraram que a fusão fagossoma-lisossoma é inibida quando os macrófagos ingerem o *M. tuberculosis*. Ainda permanecem não esclarecidos os mecanismos pelos quais os lisossomas dos macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis*, os quais contém enzimas capazes de destruir os bacilos, não se fundem com os fagossomas onde eles estão contidos.

Adicionalmente, LEAKE *et al.*,(1984) demonstraram que o *M. tuberculosis*, cepa H37Rv, microrganismo virulento, pode romper os fagossomas dos macrófagos,

enquanto microrganismos avirulentos, cepa H37Ra, permanecem dentro do fagossoma.

A multiplicação bacilar resulta na morte do macrófago e conseqüentemente na liberação de lisossomas e seu conteúdo enzimático para o tecido adjacente que induz destruição tecidual. Forma-se então no local, uma reação inflamatória inicial e inespecífica, com acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos no parênquima pulmonar, que posteriormente se cronifica dando origem aos granulomas (DANEMBERG *et al.*, 1991)

A inflamação granulomatosa é uma resposta inespecífica do hospedeiro, na qual células T e macrófagos, em vários estágios de ativação, se aglomeram em torno das células infectadas, formando uma lesão frouxamente organizada.

Macrófagos ativados produzem enzimas e radicais derivados do oxigênio, a exemplo do peróxido de hidrogênio ou do nitrogênio, os quais são eficientes para eliminar vários microrganismos, incluindo o *M. tuberculosis*. As enzimas hidrolíticas, como a fosfatase ácida e a lisozima, participam da destruição da parede celular.

Assim, na tuberculose, o macrófago alveolar tem papel direto na destruição dos bacilos e, posteriormente, na resposta imune como célula apresentadora, apresentando os componentes antigênicos do bacilo ao sistema imunológico celular, representado principalmente por células linfocitárias CD4+. Quanto ao sistema imune humoral, há estimulação de plasmócitos e a produção de anticorpos. Tais anticorpos, entretanto, não tem importância na defesa contra a doença, tendo em vista que não há demonstrações de que estes neutralizam a multiplicação bacilar intracelular.

Para a maioria dos indivíduos com função imune normal, a infecção inicial pelo *M. tuberculosis* parece ser detida quando a imunidade mediada por células se

desenvolve, apesar de pequenos números de bacilos viáveis ainda permanecerem dentro do granuloma.

1.4.2 Papel dos linfócitos CD4

A imunidade mediada por células desempenha um papel crítico na resposta protetora contra a tuberculose humana. Esta importância pode ser observada em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), as quais apresentam uma diminuição de células CD4, ao mesmo tempo em que mostram um aumento na susceptibilidade para o *M. tuberculosis*.

Os macrófagos processam antígenos e os apresentam às células T. As células T CD4+, tidas como dominantes na imunidade contra micobactéria, após reconhecerem o antígeno no contexto do complexo MHC, tornam-se ativadas e passam a secretar linfocinas. As citocinas mantêm a ativação macrofágica, o recrutamento de outras células e a proliferação celular.

A resposta imune celular pode ser esquematizada em dois grandes ramos. A resposta mediada por linfócitos TH-1, que secretam predominantemente IFN- γ e IL-2, que na tuberculose promovem a atividade micobactericida dos macrófagos através da estimulação da produção de produtos tóxicos, e favorecem a fusão do lisossoma, resultando na destruição dos bacilos. A resposta do tipo TH-2 por sua vez, é representada pela predominância da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que além de promoverem uma grande produção de anticorpos, são deativadoras de macrófagos o que favorece o crescimento bacilar. Estas citocinas não têm papel protetor na tuberculose, desde que são deativadoras dos macrófagos, favorecendo o crescimento bacilar.

1.4.3 Linfócitos T

A habilidade de um hospedeiro controlar a infecção pelo *M. tuberculosis* reside na sua capacidade de montar uma resposta imune eficaz. A imunidade celular se desenvolve quando as células T se tornam sensibilizadas após reconhecerem seu antígeno específico e, então, liberam mediadores que modulam a função do macrófago (MENDEZ-SAMPEIRO, *et al*, 1995).

Linfócitos T CD4+ $\alpha\beta$ são freqüentemente encontrados em pacientes com tuberculose (COOPER *et al.*, 1995). Estes linfócitos proliferam e produzem citocinas quando estimulados por antígenos micobacterianos *in vitro*. No entanto, existem subpopulações destes linfócitos T, o que sugere a possibilidade de haver uma distinção em seus papéis na doença e na proteção induzida por vacinas.

Uma percentagem menor de linfócitos T apresentam receptores com cadeias γ/δ . Esta população de células pode ser estimulada por componentes lipídicos da parede de micobactérias e proteínas de estresse (hsp) além de outros antígenos micobacterianos (KAUFMANN, 1995). Seu papel na resposta imune contra micobactérias aparentemente é no início da infecção, mas estas células podem ser ativadas quando os bacilos são reintroduzidos mais tarde (SIFFORD & BATES, 1991).

Linfócitos CD4+ diferem dos linfócitos CD8+ na maneira de reconhecer antígenos. Os linfócitos CD4+ reconhecem antígenos no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, enquanto linfócitos CD8+ reconhecem antígenos associados ao MHC classe I.

Sabe-se que linfócitos CD8+ são capazes de reconhecer e destruir macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* (COOPER *et al.*, 1995). Estas células são

mais freqüentes no pulmão de pacientes com tuberculose ativa se comparado a pacientes com tuberculose inativa (TAHA *et al.*, 1997). Estes autores puderam constatar o aumento de CD8+ através da análise das células presentes no lavado broncoalveolar destes dois grupos de pacientes.

1.4.4 Regulação da resposta imune em pacientes com tuberculose

O *M. tuberculosis* ao ser inalado, atinge os pulmões, onde é ingerido por macrófagos alveolares. Após a penetração do bacilo nos macrófagos do pulmão pode ocorrer a produção de enzimas proteolíticas e outros metabólitos que mostram efeitos micobactericidas e/ou produção de mediadores (citocinas) pelos macrófagos em resposta ao *M. tuberculosis* (BARNES *et al.*, 1993). As citocinas têm a capacidade de exercer efeitos imuno-regulatórios e mediar muitas manifestações clínicas da tuberculose (HO *et al.*, 1997).

O papel de macrófagos e as citocinas produzidas por estas células em resposta à infecção pode interferir na resposta de células T (JONHSON *et al.*, 1994). Macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* produzem citocinas como IL-1, IL-10 e TNF- α , enquanto que monócitos expostos ao PPD secretam IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β . (TOOSSI *et al.*, 1997).

Citocinas imuno-supressoras, como IL-10 e TGF- β , são produzidas por macrófagos no sítio da doença, principalmente, para reduzir a inflamação excessiva e destruição tecidual (BARNES *et al.*, 1993; TOOSSI *et al.*, 1997), e suprimir a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ pelos linfócitos T reativos aos produtos micobacterianos (HIRSCH, C.S. *et al.*, 1996). Estas citocinas podem modular a resposta imune e limitar a extensão da destruição do tecido. Por outro lado, a produção excessiva de citocinas imuno-supressoras pode resultar na falha do

controle da infecção.

Observa-se também a expressão de IL-10 inibindo a produção de citocinas por monócitos e linfócitos. A IL-10 pode ser produzida por macrófagos infectados por micobactérias. O efeito inibitório desta citocina tem sido demonstrado na literatura (FIORENTINO *et al.*,1991). A presença da IL-10 pode suprimir a proliferação linfocitária (BARNES *et al.*, 1993) e suprime a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4+. Neste contexto, esta citocina pode regular a resposta TH1 observada no sítio da infecção por micobactéria (BARNES, 1994).

Dentre as citocinas imuno-supressoras está também o TGF- β que é produzida constitutivamente por monócitos de pacientes com tuberculose. A produção local de TGF- β pode resultar em deativação de macrófagos e em imuno-patologia. Além da inibição da função do macrófago, o TGF- β é também capaz de suprimir a produção de células T (DING *et al.*,1992; PALLADINO *et al.*, 1990).

As citocinas tipo TH1, como IFN- γ , podem aumentar a apresentação de antígenos, estimular a atividade microbida dos macrófagos infectados e aumentar a produção de monocinas. Entretanto, a resposta imune protetora pode também causar necrose tecidual significativa, bem como efeitos sistêmicos a exemplo de febre, perda de peso decorrente principalmente da liberação de citocinas como TNF- α na circulação (BEUTLER & CERAMI,1987).

O TNF- α associa-se ao IFN- γ para aumentar a produção de metabólitos do óxido nítrico (DING *et al.*,1992) e matar micobactérias (BERMUDEZ *et al.*, 1995). O TNF- α tem importante papel no recrutamento de outras células para o foco inflamatório, formando o granuloma, além de contribuir para a destruição intracelular dos bacilos (KINDLER *et al.*,1989). TNF- α e IL-12 juntos induzem a produção de IFN- γ pelas células NK, o qual potencializa a atividade microbida dos macrófagos

(D'ANDREA *et al.*,1993). A produção do TNF- α por monócitos é aumentada em pacientes com tuberculose (TAKASHIMA *et al.*,1990; OGAWA *et al.*, 1991).

Outros elementos, além das citocinas, podem ter influência na resposta imune. Carboidratos, componentes glicolipídicos das paredes das micobactérias, bem como proteínas secretadas, podem disparar os efeitos imuno-supressores dos macrófagos em pacientes com tuberculose. A lipoarabinomanana (LAM), um heteropolissacáride complexo, está encaixado na membrana celular da micobactéria e suprime a resposta proliferativa para o *M. tuberculosis* (MORENO *et al.*,1988), possivelmente induzindo diretamente macrófagos a liberarem citocinas imuno-supressoras como a IL-10 (BARNES *et al.*,1993). A LAM inibe a produção de IFN- γ por macrófagos, liga-se aos radicais livres de oxigênio impedindo uma maior destruição dos patógenos intracelulares e induz a produção de TGF- β (DAHL, *et al.*,1996).

Sabe-se que pacientes com tuberculose têm uma supressão parcial da resposta imune, que se caracteriza pela diminuição da hipersensibilidade tardia (DTH), diminuição da resposta proliferativa ao PPD e da produção de IL-2 e IFN- γ (TOOSSI *et al.*,1997). Há relatos também de aumento de IgG, IgM e IgE para alguns antígenos, como reflexo de uma ativação policlonal B (HUSSAIN *et al.*,1995).

A resposta imunológica de indivíduos infectados que desenvolvem ou não a tuberculose é objeto de diversos estudos. O que conduz esta necessidade é o desconhecimento da resposta imunológica definida pelos indivíduos que mantêm a bactéria numa forma latente, ou aqueles indivíduos que, apesar da imunidade celular preservada, não conseguem controlar a doença, desenvolvendo os estágios clínicos mínimo, moderado e avançado.

Os estudos que tratam da produção de citocinas por células T em humanos em resposta ao *M. tuberculosis* são conflitantes. Alguns deles indicam que clones de células T reativas ao *M. tuberculosis*, estimulados *in vitro*, apresentam resposta TH₁, produzindo altas concentrações de IFN- γ , e baixas concentrações de IL-4 e IL-5 (DEL PRETE *et al.*, 1993; HAANEN *et al.*, 1991). Por outro lado, outros estudos demonstram que clones de células T reativas ao *M. tuberculosis* secretam IFN- γ e IL-4 (BOOM *et al.*, 1991), ou ainda IFN- γ , IL-2, IL-5 e IL-10 (BARNES *et al.*, 1993), citocinas produzidas na resposta TH₁ e TH₂.

A contradição desses estudos pode refletir a resposta das subpopulações de células T *in vitro*, mas pode não refletir os eventos *in vivo* e isto é crítico na avaliação da resposta imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar. Por esse motivo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas para avaliação imunológica dos indivíduos que controlam ou não a proliferação bacteriana na tuberculose pulmonar.

2. OBJETIVOS

A hipótese do nosso estudo é de que os níveis de citocinas variam em diferentes estágios clínicos da tuberculose pulmonar, com implicações na resposta imunológica dos pacientes ao *Mycobacterium tuberculosis*.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de citocinas ativadoras e deativadoras de macrófagos e inflamatórias, em diferentes estágios clínicos da tuberculose pulmonar humana, pelo uso da técnica de sangue total.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dosar as citocinas interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), produzidas pelas células do sangue de pacientes em diferentes estágios da tuberculose pulmonar humana, em resposta ao PPD e filtrado de cultura de *M. tuberculosis in vitro*:

- a) correlacionar a produção destas citocinas com a classificação clínico-radiológica da ATS para tuberculose pulmonar.
- b) avaliar se os antígenos citados induzem a produção diferenciada de citocinas que indiquem proteção (IFN- γ), dano tecidual (TNF- α) ou supressão da imunidade celular (IL-10) ;

3. JUSTIFICATIVA

A tuberculose continua sendo um importante problema para a saúde pública no Brasil e no mundo. Atualmente, a epidemia de AIDS e o aparecimento de cepas do *M. tuberculosis* resistentes às drogas, indicam um estado de emergência. A falta de uma vacina eficaz e, principalmente, o desconhecimento dos mecanismos imunológicos operantes na infecção e nas manifestações desta doença, são impecilhos para o seu controle e para uma possível erradicação no futuro.

Para a avaliação da eficácia de novas vacinas contra a tuberculose há necessidade de se conhecer primeiramente qual é a resposta imune protetora, tanto nos indivíduos que mesmo infectados não desenvolvem doença, como naqueles que têm a forma de tuberculose menos grave. É ainda importante avaliar os mecanismos protetores induzidos pelo BCG.

A necessidade de conhecer a imunopatologia da tuberculose justifica o estudo do papel de citocinas imuno-moduladoras da resposta imune em indivíduos infectados e em pacientes com as várias formas de tuberculose.

Para enfrentar o problema da tuberculose serão necessárias novas vacinas e novas drogas ou novos esquemas de tratamento. Para o desenvolvimento de novas vacinas existem dificuldades importantes, tais como:

- a avaliação deve ser feita através de marcadores de proteção, visto que os ensaios de proteção efetiva contra tuberculose necessitarão de grandes populações e acompanhamento prolongado;
- o método a ser utilizado deve ser de fácil realização para permitir a avaliação de

grande número de indivíduos;

- os resultados dos testes a serem empregados deverão ser reprodutíveis em diferentes regiões.

Por estas razões, faz-se necessário a padronização de um ensaio de avaliação da imunidade celular que seja rápido e de fácil aplicação em grandes grupos populacionais.

Estudos realizados utilizando-se células mononucleares de sangue periférico demonstram uma contradição na resposta imune ou das subpopulações de células T, tendo em vista que não reproduzem o que acontece *in vivo*. Entretanto, a técnica de sangue total vem sendo desenvolvida para avaliação da resposta imune em doenças como meningite (PRINS *et al.*, 1998), herpes vírus (CHIU *et al.*, 1998), etc. Esse estudo envolveu a técnica de sangue total, que como outras, apresenta vantagens e desvantagens.

A técnica de separação de células mononucleares purificadas do sangue periférico apresenta como vantagens a possibilidade de ajuste no número de células e uma menor interferência de outras populações de células. Já a técnica de sangue total tornou-se vantajosa por apresentar maior rapidez no seu procedimento, o que garante um trabalho com maior número de indivíduos, desta forma facilitando o desenvolvimento dos estudos de vacinas. Essa técnica também utiliza uma quantidade de sangue menor por não exigir a separação de células no seu desenvolvimento, e permite uma reprodução mais eficaz do que ocorre *in vivo*.

A Organização Mundial de Saúde propôs a realização de um estudo multicêntrico em diferentes regiões do mundo, para avaliação da exequibilidade da técnica de produção de citocinas no sangue total de pacientes com diferentes estágios clínicos da tuberculose pulmonar humana, com a finalidade de verificar a

possível existência de um balanço entre as citocinas envolvidas na resposta imunológica dessa doença. O presente trabalho faz parte deste estudo multicêntrico.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Participaram do presente estudo vinte e dois pacientes com tuberculose pulmonar. Os pacientes foram avaliados por critérios bacteriológicos (cultura e baciloscopia) e classificados de acordo com as normas da *American Thoracic Society* com base em observações radiológicas. Sete pacientes foram classificados no estágio mínimo de tuberculose pulmonar, oito pacientes com estágio moderado de tuberculose pulmonar e sete pacientes com estágio avançado de tuberculose pulmonar.

Os critérios de inclusão utilizados foram:

- diagnóstico recente (menos de um mês de tratamento);
- exame de escarro positivo;
- reatividade ao teste de PPD;
- idade abaixo de 65 anos (anexo);

Os critérios de exclusão foram:

- cultura negativa para *M. tuberculosis*;
- positividade na sorologia para HIV;
- presença de doença crônica (neoplasia, diabetes, etc.);
- presença de história prévia de tuberculose;
- presença de desnutrição grave.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Reagentes e estimulação

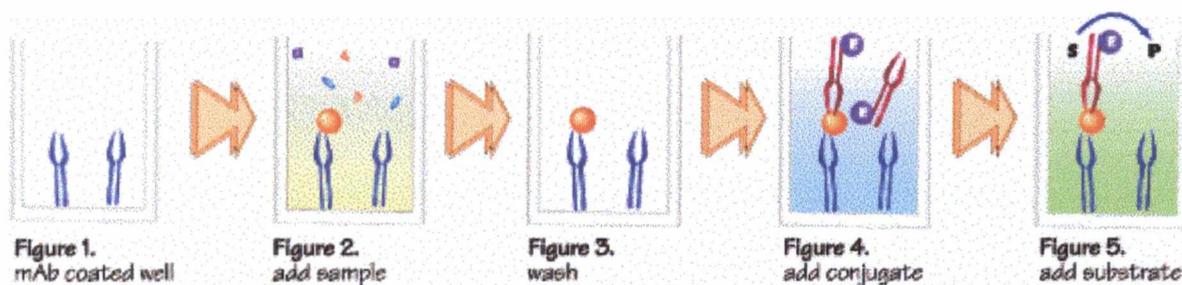
Cada paciente foi submetido à coleta de 03 mililitros de sangue periférico por venopunção com tubo vacutainer (Vacuum II – Labnew), usando heparina como anticoagulante. O processamento do material foi realizado dentro de um período de duas horas. Dois ml de sangue foram utilizados para a avaliação hematológica (anexo), e 1ml foi reservado para avaliação, imunológica como indicado:

Um mililitro de sangue foi diluído (1:10) em RPMI completo (RPMI, L-glutamina 2 mMol/ml, penicilina 50 U/ml e gentamicina 5ug/ml – GIBCO Laboratories; Grand Island, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal normal inativado pelo calor. Alíquotas de 1 mililitro foram cultivadas em estufa de CO₂ a 37⁰C em placas de 24 poços (Falcon), seguindo as seguintes condições: um poço com 1 mililitro de sangue diluído e sem estímulo; um poço com 1 mililitro de sangue diluído e estimulado com 20 µg/ml de PPD (Statens Serum Institute, estoque 10 mg/ml) I e um poço com 1 mililitro de sangue diluído e estimulado com 5µg/ml de filtrado de cultura de *M. tuberculosis* (H37Rv, University of Colorado, estoque 1 mg/ml), concentrações estabelecidas pela OMS por se tratar de um estudo multicêntrico com protocolo igual para todos os participantes.

Os sobrenadantes foram colhidos após 72 horas, separados em quatro alíquotas de 250µl e estocados a -70⁰C até a realização dos testes.

Avaliação da produção de citocinas

Os sobrenadantes provenientes do sangue total foram testados por um ensaio imuno-enzimático para citocinas. Este ensaio é utilizado pela rapidez, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Foram utilizados os seguintes kits para a determinação dos níveis de citocinas: Human Elisa IFN γ (Endogen, MA), TNF Kit e Interleukin-10 Kit (Genzyme, MA). Foram seguidas as instruções especificadas por cada fabricante. Todos os ensaios consistiram de ELISA tipo “sanduíche”, onde os sobrenadantes das culturas foram incubados em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpo anti-citocina específico (para IFN- γ , IL-10 ou TNF- α) e depois expostos a um segundo anticorpo anti-citocina específico conjugado à peroxidase (Quadro 1). A extensão da reação de degradação do substrato peróxido de hidrogênio, em contato com os anticorpos marcados com peroxidase, era determinada pela variação da coloração do TMB (3,3',5,5'- Tetramethyl - Benzidine - 1mg/Sigma) . A reação era interrompida com a utilização de ácido sulfúrico 2N e a intensidade de coloração era determinada em espectrofotômetro de placa a 405 nm (Molecular Devices E max). Os resultados foram então analisados com o auxílio do programa SoftMax (Molecular Devices). Foi utilizada uma curva padrão para obtenção dos resultados em pg/ml.



Quadro 1. Esquema ilustrando as etapas de realização do ensaio de ELISA “sanduíche”. Adaptado de http://cytokine.rndsystems.com/cyt_cat/cyt_cat.html.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn que compara os grupos envolvidos no estudo. Foram considerados significativas as diferenças, quando $p < 0,05$. Tendo em vista a dispersão dos dados apresentados, os resultados foram expressos em mediana.

5. RESULTADOS

A produção de IFN- γ em resposta ao estímulo com PPD *in vitro* foi de 861pg/ml, 255 pg/ml e 56 pg/ml nas culturas do sangue obtidas de pacientes nos estágios de tuberculose mínima, moderada e avançada, respectivamente e em resposta ao filtrado de cultura de *M. tuberculosis* foi de 642 pg/ml, 13 pg/ml e 189 pg/ml para os mesmos estágios clínicos. Esses resultados estão representados graficamente na Figura 1. As diferenças entre os grupos não atingem significância estatística ($p > 0,05$). Apesar disto, quando comparamos pacientes com tuberculose mínima e avançada, podemos observar que quatro dos sete pacientes com a forma mínima produzem níveis de IFN- γ iguais ou maiores que 500 pg/ml; somente um dos sete pacientes com a forma avançada produziu mais de 500pg/ml de IFN- γ . A produção de IFN- γ em resposta ao filtrado de cultura do antígeno total de *M. tuberculosis* (Fig.1) demonstra que a resposta de pacientes com a forma mínima foi maior que a de pacientes com estágio moderado ou avançado, mas a diferença não foi estatisticamente significativa.

O TNF- α foi também detectado nos sobrenadantes dos cultivos do sangue de pacientes com tuberculose pulmonar em resposta ao PPD ou filtrado de cultura do *M. tuberculosis*. Os níveis de TNF- α encontrados em resposta ao PPD foram de 30pg/ml, 70pg/ml e 68 pg/ml e em resposta ao filtrado de cultura de *M. tuberculosis* foram de 95 pg/ml, 59 pg/ml e 236 pg/ml respectivamente em pacientes com tuberculose pulmonar mínima, moderada e avançada (Fig.2), embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significante. Ao contrário do IFN- γ , os níveis de TNF- α , em resposta aos estímulos estudados, foram maiores nos estágios mais avançados de tuberculose pulmonar, e menor nos pacientes com menor extensão pulmonar da doença

Os sobrenadantes da cultura de pacientes com tuberculose pulmonar após estimulação com PPD ou filtrado do *M. tuberculosis* também continham IL-10. Os níveis de IL-10 após estímulo pelo PPD foram de 19pg/ml, 16 pg/ml e 38pg/ml nos pacientes com estágio mínimo, moderado e avançado, respectivamente (Fig. 3). Estas células estimuladas com PPD demonstraram que a produção de IL-10 foi discreta nos estágios mínimo e moderado, porém bastante importante no avançado,. Células de pacientes com tuberculose produziram 25 pg/ml, 19 pg/ml e 4 pg/ml de IL-10 nos estágios mínimo, moderado e avançado, respectivamente, com estímulo de *M.tb*. As diferenças não foram estatisticamente significantes, mesmo se compararmos a quantidade de IL-10 detectada nos pacientes com tuberculose mínima com os níveis detectados em pacientes com tuberculose avançada, independente do estímulo *in vitro*.

Com objetivo de analisar comparativamente o balanço entre duas das mais importantes citocinas para a imuno-regulação da tuberculose humana, foram construídos gráficos comparando-se os níveis de IFN- γ e TNF- α presentes nos cultivos. A Figura 4 mostra estas comparações em resposta ao PPD ou filtrado do *M. tuberculosis*, respectivamente. Nelas observa-se que à medida que aumenta a extensão da doença, diminuem os níveis de IFN- γ e aumentam os níveis de TNF- α .

Fig. 3

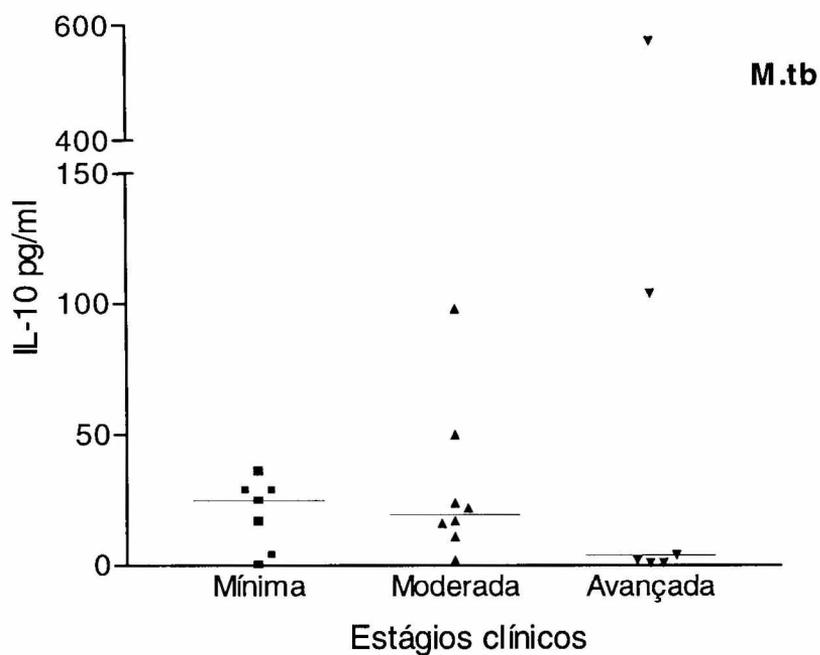
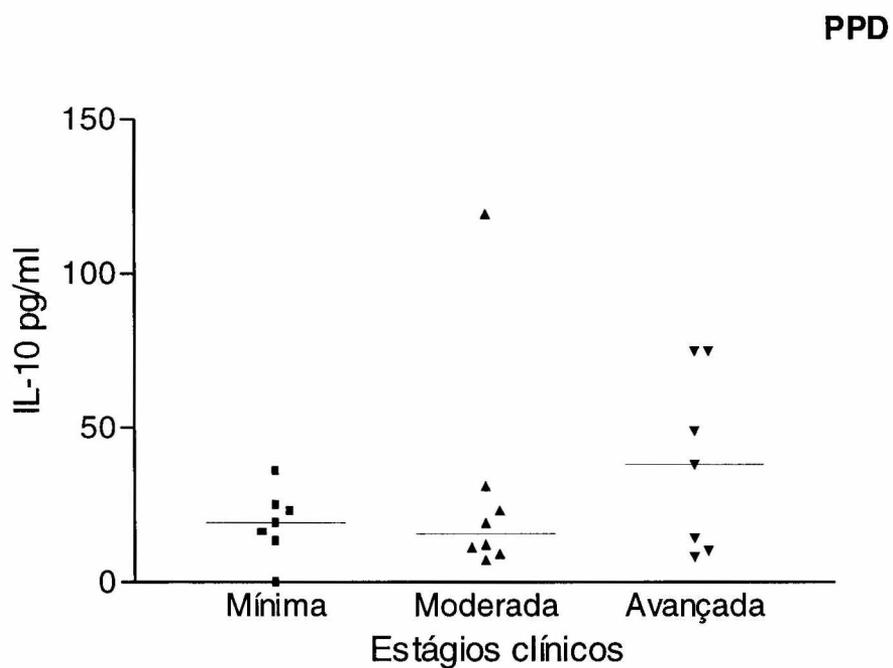


Figura 3. Níveis de IL-10 detectados nos sobrenadantes de cultivos de células do sangue de pacientes com diferentes estágios da tuberculose pulmonar. Resposta ao PPD ao filtrado do *M. tuberculosis* (M.tb).

Fig. 4

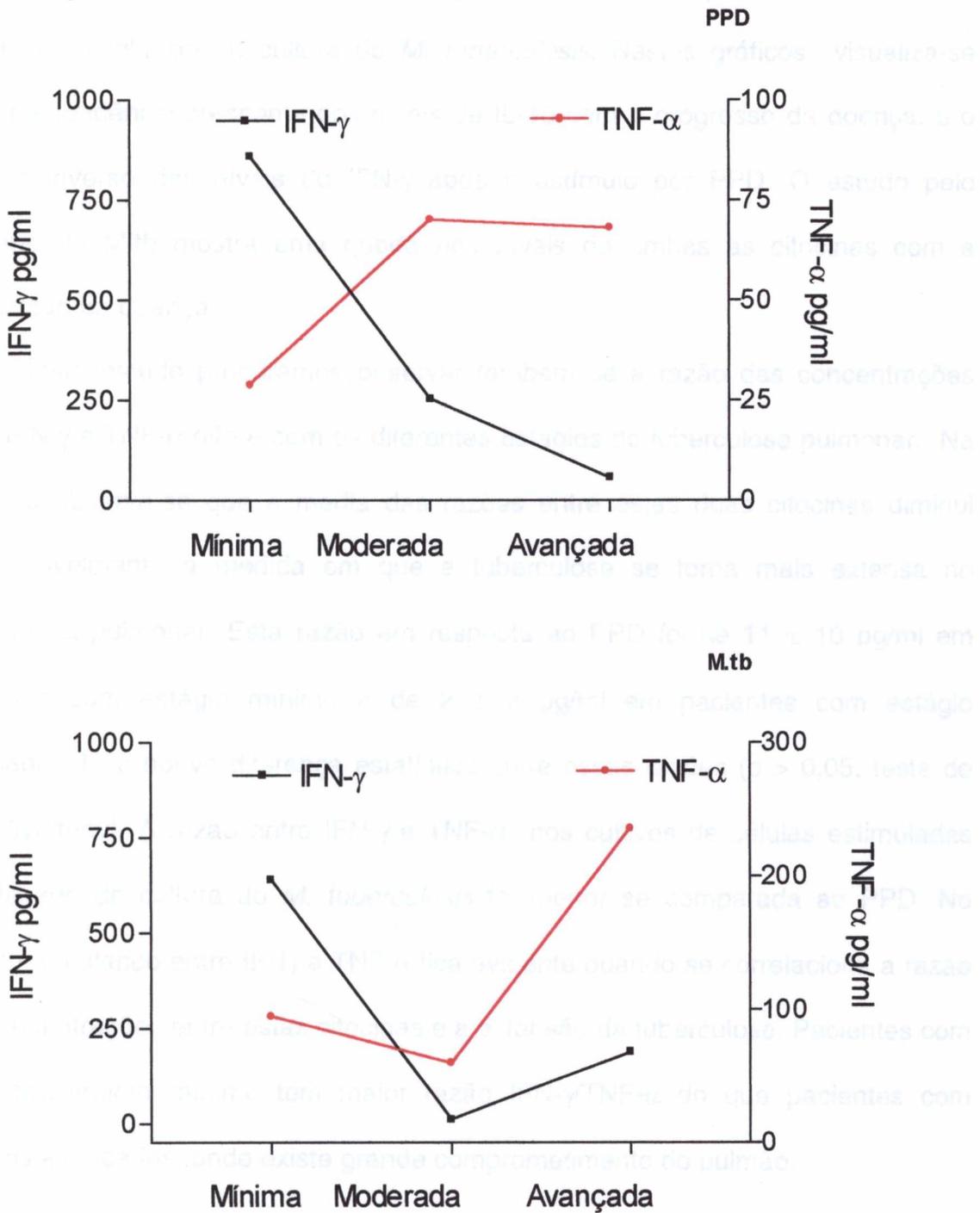


Figura 4. Comparação dos níveis de IFN- γ e TNF- α produzidos em resposta ao PPD e M.tb, detectados nos sobrenadantes de cultivos de células do sangue de pacientes com diferentes estágios da tuberculose pulmonar. Cada ponto representa a mediana do grupo.

A Figura 5 representa comparativamente os resultados de IFN- γ e IL-10 obtidos de pacientes com diferentes estágios da tuberculose pulmonar estimuladas com PPD ou filtrado de cultura do *M. tuberculosis*. Nestes gráficos visualiza-se melhor a tendência crescente dos níveis de IL-10 com o progresso da doença, e o aspecto inverso dos níveis de IFN- γ após o estímulo por PPD. O estudo pelo antígeno de M.tb mostra uma queda nos níveis de ambas as citocinas com a progressão da doença.

Neste estudo procuramos observar também se a razão das concentraes entre IFN- γ e TNF- α difere com os diferentes estágios da tuberculose pulmonar. Na Figura 6 observa-se que a média das razões entre estas duas citocinas diminui consideravelmente  medida em que a tuberculose se torna mais extensa no parênquima pulmonar. Esta razão em resposta ao PPD foi de 11 ± 10 pg/ml em pacientes com estágio mínimo e de 2 ± 2 pg/ml em pacientes com estágio avançado. Não houve diferença estatística entre essas razões ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney). A razão entre IFN- γ e TNF- α nos cultivos de células estimuladas com filtrado de cultura do *M. tuberculosis* foi menor se comparada ao PPD. No entanto, o balanço entre IFN γ e TNF- α fica evidente quando se correlaciona a razão das concentraes entre estas citocinas e a extensão da tuberculose. Pacientes com comprometimento mínimo tem maior razão IFN- γ /TNF- α do que pacientes com estágios avançados, onde existe grande comprometimento do pulmão.

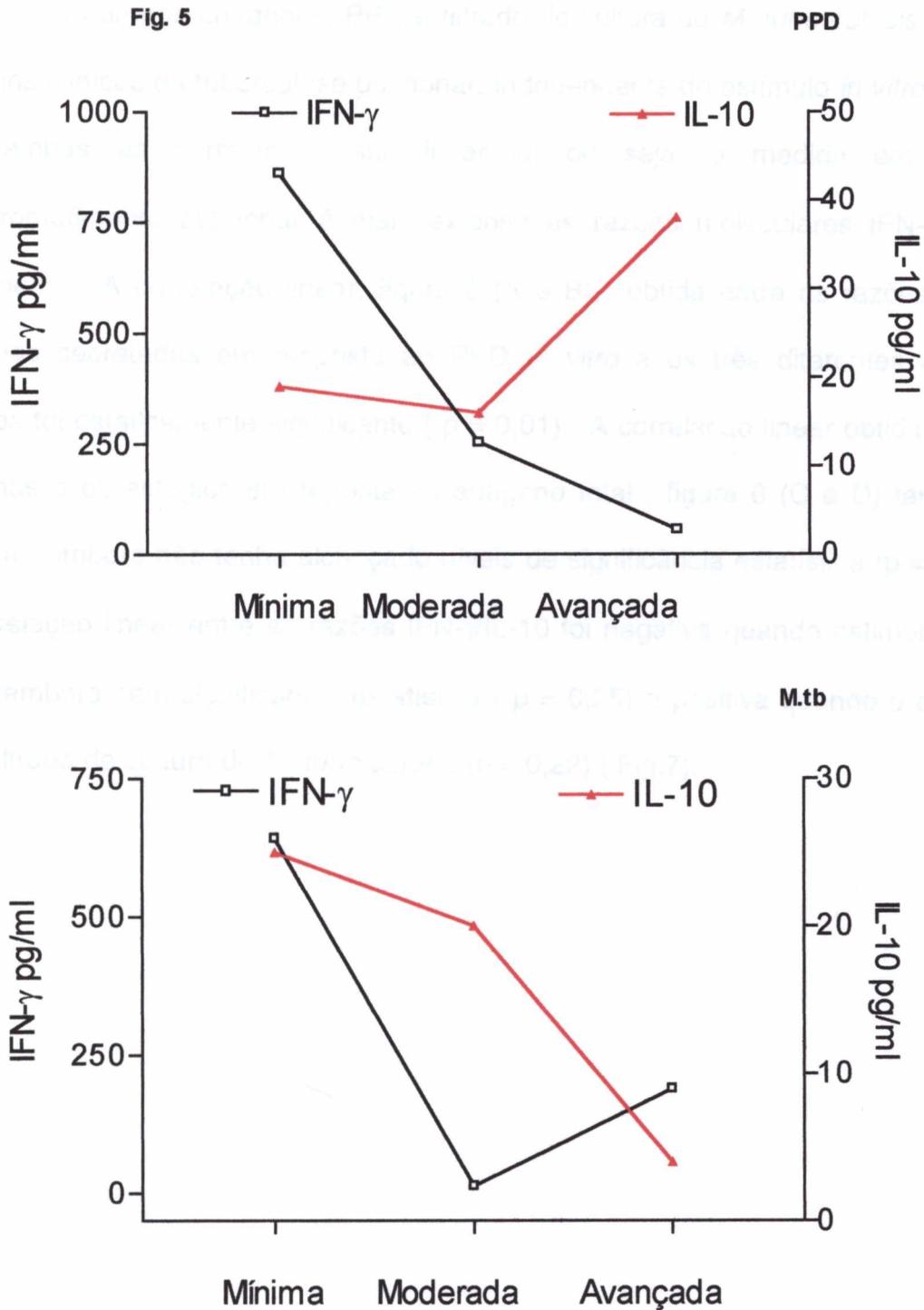


Figura 5. Comparação dos níveis de IFN- γ e IL-10 em resposta ao filtrado de cultura do PPD e *M. tuberculosis* presentes nos sobrenadantes de cultivos de células do sangue de pacientes com diferentes estágios da tuberculose pulmonar. Cada ponto representa a mediana do grupo.

Na Figura 6 observam-se as correlações lineares das razões IFN- γ /TNF- α obtidas com ambos antígenos, PPD e filtrado de cultura do *M. tuberculosis*, com os estágios clínicos da tuberculose pulmonar. Independente do estímulo *in vitro* nota-se que ambas as correlações são inversas, ou seja, à medida em que o comprometimento pulmonar é mais extenso as razões moleculares IFN- γ /TNF- α diminuem. A correlação linear, figura 6 (A e B), obtida entre as razões destas citocinas secretadas em resposta ao PPD *in vitro* e os três diferentes estágios clínicos foi estaticamente significativa ($p = 0,01$). A correlação linear obtida com as citocinas e os estágios em resposta ao antígeno total , figura 6 (C e D) também é inversa , embora não tenha alcançado níveis de significância estatística ($p = 0,057$). A correlação linear entre as razões IFN- γ /IL-10 foi negativa quando estimulada por PPD, embora sem significância estatística ($p = 0,25$) e positiva quando o estímulo foi o filtrado de cultura do *M. tuberculosis* ($p = 0,22$) (Fig.7).

Fig. 6

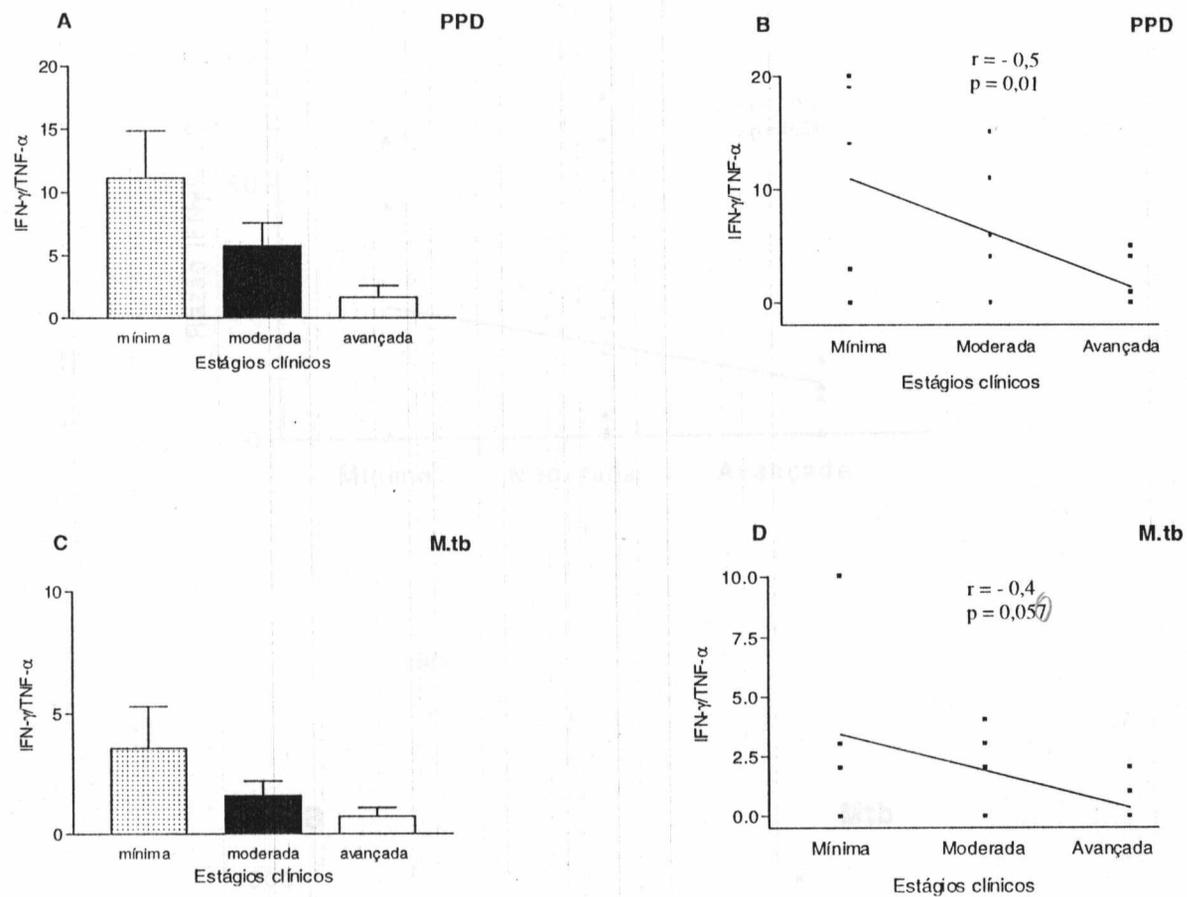


Figura 6. Razão das concentrações entre IFN- γ e TNF- α nos diferentes estágios da tuberculose pulmonar. A e C representam a resposta *in vitro* ao PPD e filtrado de cultura do *M. tuberculosis* respectivamente. B e D representam graficamente as correlações lineares entre as razões moleculares e os estágios da doença.

Fig. 7

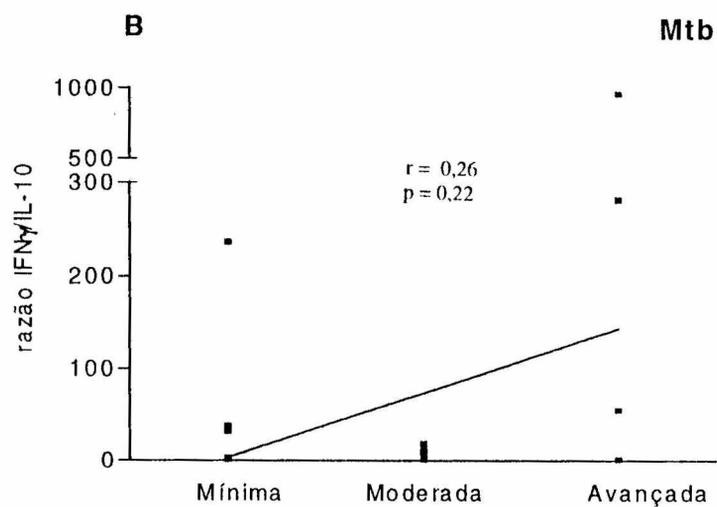
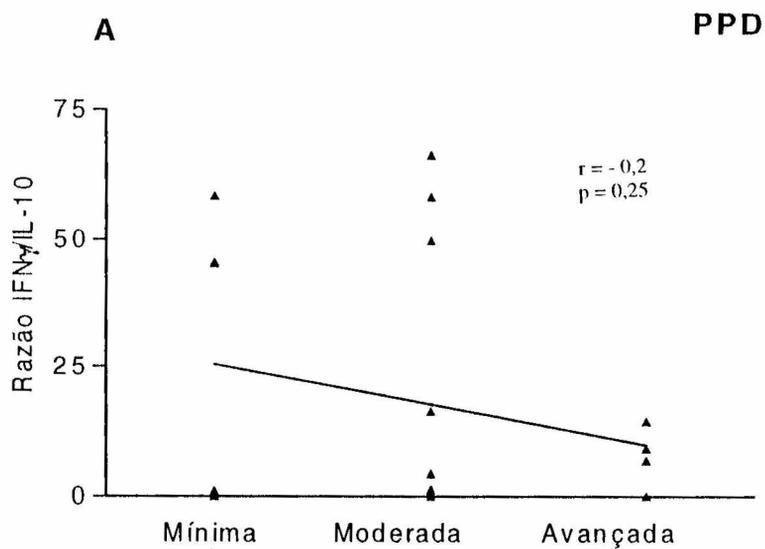


Figura 7. Correlação linear das razões entre as concentrações de IFN- γ e IL-10 nos diferentes estágios da tuberculose pulmonar em resposta ao PPD e ao filtrado de cultura do *M. tuberculosis* (A e B, respectivamente).

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, avaliamos a produção de citocinas consideradas importantes para a resposta imune de pacientes com tuberculose pulmonar. Utilizamos pacientes bem caracterizados em diferentes estágios clínicos da tuberculose (segundo a classificação da ATS). Uma caracterização precisa dos pacientes nem sempre foi realizada em estudos anteriores. Outro aspecto a salientar no presente estudo é a utilização do cultivo de sangue não fracionado, e estimulado *in vitro*, para avaliação da imunidade celular.

No presente estudo, os níveis de citocinas produzidas pelas células do sangue total foram obtidas em resposta ao PPD e M.tb. A comparação entre o perfil destas citocinas induzidas por estes antígenos revela que o antígeno total tem capacidade relativamente maior de induzir TNF- α (30 pg/ml x 95 pg/ml; 68 pg/ml x 236 pg/ml), em células de pacientes com as formas mínima e avançada em resposta ao PPD e M.tb, respectivamente.

As diferenças na produção de IFN- γ , TNF- α ou IL-10, entre os diferentes grupos estudados, não foram estatisticamente significantes, embora sejam observadas tendências de redução do IFN- γ e aumento de TNF- α e IL-10 nos quadros mais avançados da tuberculose pulmonar. A falta de significância estatística pode se dever ao pequeno número de pacientes em cada grupo, associado à dispersão dos dados. Tal dispersão é observada normalmente em estudos com pacientes devido a heterogeneidade de população.

Como as citocinas não atuam isoladamente, o resultado final de sua ação depende da sua concentração relativa em relação a outros produtos. Visando expressar este balanço, trabalhamos com as razões dos níveis de citocinas.

Adicionalmente, a razão apresenta a vantagem de reduzir a dispersão dos dados. Este elemento explica, em parte, que as comparações das razões atinjam níveis de significância estatística quando os valores isoladamente não atingiram.

A escolha das razões de IFN- γ /TNF- α e IFN- γ /IL-10 deve-se ao conhecimento prévio da ação destas citocinas, e o seu possível envolvimento na tuberculose.

Os relatos de DEL PRETE *et al.*, (1993) sobre a participação de citocinas regulatórias e inflamatórias sugerem que estes produtos podem exercer diferentes papéis na resposta imune em pacientes com tuberculose pulmonar. O IFN- γ parece estar mais envolvido com proteção, enquanto o TNF- α está aparentemente relacionado com dano tecidual e a IL-10 participa na supressão da imunidade celular.

O IFN- γ é a citocina imuno-regulatória mais potente na ativação de macrófagos pois, além de aumentar a sua ativação, aumenta a apresentação de antígeno pelos macrófagos (BERMUDEZ & KAPLAN, 1995).

O papel do IFN- γ na imunidade protetora tem sido demonstrado mais claramente em modelos murinos da tuberculose (YANG *et al.*, 1998). O papel do IFN- γ na imuno-regulação da tuberculose humana não foi ainda completamente esclarecido. Sabe-se que indivíduos doentes produzem IFN- γ , no entanto, a presença de um defeito genético que resulta em alteração do receptor desta citocina favorece doenças micobacterianas (BELLAMY, 1998). Sabe-se também que pacientes com tuberculose multi-resistente se beneficiam com o tratamento com IFN- γ recombinante (BLACK *et al.*, 1987).

Segundo nossos resultados, as concentrações de IFN- γ são variáveis dentro dos estágios clínicos da doença. A tuberculose no estágio mínimo apresenta níveis de IFN- γ mais elevados quando comparados com os estágios moderado e

avançado. Isto sugere que a evolução da doença pode sofrer influência da concentração desta citocina, e nossos dados apontam para isso. SODHI *et al.*, (1997) demonstraram que pacientes com tuberculose grave apresentam uma redução na produção de IFN- γ por células mononucleares purificadas. Esses achados são concordantes com nossos resultados, e os achados do nosso estudo indicam que uma redução nos níveis de IFN- γ podem estar associados ao estágio avançado da tuberculose pulmonar.

Estudos realizados por ZHANG *et al.*,(1995), revelam que as concentrações de IFN- γ em pacientes saudáveis respondedores ao PPD (PPD+) foram altas e que a produção de citocinas como IFN- γ e IL-2 estavam diminuídas em pacientes com tuberculose. ROBINSON *et al.*,(1994), mostraram que a maior parte das células do lavado expressam IFN- γ e esta expressão pode contribuir para a resposta imune celular local na tuberculose pulmonar.

A IL-10 é conhecida como reguladora negativa da expansão de células TH1. Ela participa inibindo a atividade de macrófagos *in vitro* o que provavelmente contribui para a sobrevivência da micobactéria no interior da célula (MURRAY *et al.*,1997). Nossos estudos mostram que à medida que a doença evolui as concentrações de IL-10 aumentam.

Estudos realizados por FIORENTINO *et al.*, (1991) revelam que a potente ação da IL-10 em macrófagos, particularmente na produção de monocinas, desempenha importante papel não apenas na regulação da resposta de células T, mas também na resposta inflamatória local. D'ANDREA *et al.*,(1993), em seu estudo, sugeriu que a inibição de IFN- γ pela produção de IL-10 é fundamentalmente importante para o bloqueio da produção de IFN- γ , e de moléculas co-estimulatórias. Estes achados contribuem para a interpretação dos nossos resultados, tendo em

vista que pacientes com doença mais grave, com maior comprometimento pulmonar, apresentam concentrações de IL-10 maiores que pacientes com doença mínima.

Os nossos dados mostram que TNF- α e IL-10 estão mais elevados nas fases mais avançadas da doença, e podem estar contribuindo para a progressão da patologia. Estudos realizados por DONNELLY *et al.*,(1995), indicam que a produção elevada de TNF- α (induzida por IFN- γ sobre monócitos) está associada à inibição da expressão de IL-10 endógena. É possível que na ausência de IL-10 nos estágios avançados da tuberculose, a produção de TNF- α fosse ainda maior. Neste caso a IL-10 poderia estar desempenhando um papel duplo. Por um lado, facilita a multiplicação bacilar, e por outro limita o dano tecidual ao reduzir a produção de TNF- α . De toda forma, esta hipótese necessita ser avaliada experimentalmente.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, altamente pirogênica, que induz à perda de peso e participa na formação de granulomas (SMITH *et al.*,1997). Seu papel no granuloma deve-se ao macrófago, que contribui para a contenção da infecção pela micobactéria (BARNES *et al.*, 1993). VALONE *et al.*,(1988), demonstraram recentemente que tanto *M. bovis* (BCG) quanto produtos micobacterianos podem induzir diretamente a produção de TNF- α em monócitos e macrófagos alveolares . A formação de granuloma em resposta a infecção com BCG pode ser abolida com a administração de anticorpos anti-TNF- α em camundongos(MARINO *et al.*,1997).

O papel protetor do TNF- α na tuberculose murina pode ser evidenciado nos ensaios de bloqueio desta citocina com anticorpos neutralizantes durante a infecção *in vivo*, quando ocorre aumento da carga bacilífera, como foi demonstrado por KINDLER *et al.*,(1989). No entanto o papel benéfico do TNF- α não tem sido evidente em pacientes com tuberculose pulmonar. Nosso estudo revela que pacientes com

estágio avançado da doença apresentam concentrações elevadas de TNF- α e, em contrapartida, pacientes com estágio mínimo apresentam baixas concentrações desta citocina.

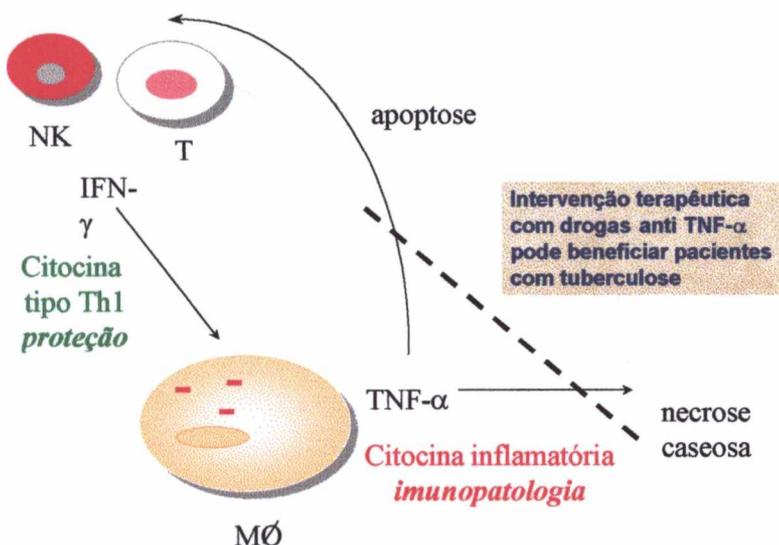
Utilizando um sistema *in vitro*, FLESH *et al.*, (1990) demonstraram que o efeito micobacteriano do TNF- α depende do IFN- γ . É possível, assim, que a redução da produção do IFN- γ observado nos pacientes com a forma avançada da tuberculose limite os efeitos benéficos desta citocina, e sejam mais evidentes os efeitos deletérios de lesão tecidual. SILVER *et al.*, (1998).; HERNANDEZ-PANDO *et al.*,(1994) relataram que o TNF- α pode desempenhar um papel de proteção na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, mas esta citocina também desempenha importante papel no desgaste e necrose tecidual que caracteriza a tuberculose ativa, o que reforça a nossa hipótese (Esquema 01).

Uma considerável liberação de TNF- α e sua relação com necrose, febre e perda de peso na tuberculose já foi relatada (HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 1994; JEUFFERMANS *et al.*, 1998). Esses dados apresentam concordância com nosso estudo, tendo em vista que pacientes com tuberculose mínima apresentam níveis baixos de TNF- α e aqueles com tuberculose avançada apresentam títulos mais elevados desta citocina. Nos casos de lesões mínimas há ausência de cavitação característica da formação de necrose caseosa. À medida que a doença se torna mais grave o comprometimento do parênquima pulmonar também evolui chegando a atingir cavitação com dimensões acima de 4mm de diâmetro, característico da tuberculose no estágio avançado, e nestes casos os níveis de TNF- α são mais elevados.

Diversos estudos vem sendo realizados utilizando drogas capazes de inibir a ação do TNF- α , a exemplo da talidomida. Esta droga é um potente agente imuno-

supressor que causa a redução de monócitos do sangue periférico, bem como a inibição da quimiotaxia de neutrófilos (HASLETT *et al.*, 1997). A talidomida regula a expressão de marcadores de superfície de monócitos, bem como a expressão de moléculas de adesão de linfócitos, monócitos e granulócitos, além de inibir a produção de TNF- α por células mononucleares (HASLETT *et al.*, 1998). O uso da talidomida em pacientes levou a ganho de peso e diminuição da sintomatologia na tuberculose humana (KAPLAN *et al.*, 1994).

Dados da literatura mais recentemente publicados mostram que o TNF- α induz a morte celular ou apoptose (JAWETT *et al.*, 1997). É possível que o TNF- α produzido por macrófagos infectados possa estar induzindo apoptose em linfócitos, o que reduziria o número de linfócitos T e, por consequência, uma redução da produção de IFN- γ (Esquema 01). É possível que este mecanismo esteja envolvido na redução dos níveis de IFN- γ , paralelo ao aumento de TNF- α observado por nós. Esta hipótese necessita maior investigação.

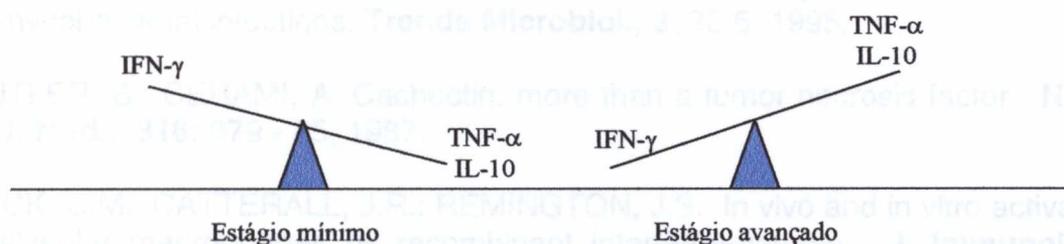


Esquema 01 - Indução de apoptose e necrose tecidual por TNF- α .

CONCLUSÃO

Os nossos dados mostram que o equilíbrio entre diferentes citocinas é distinto em pacientes classificados nos estágios mínimo, moderado ou avançado da tuberculose pulmonar. No estágio mínimo há um predomínio de IFN- γ e níveis menos elevados de TNF- α e IL-10. No estágio avançado, há um predomínio de TNF- α e IL-10 com níveis menos elevados de IFN- γ (Esquema 2). O estágio moderado apresenta níveis intermediários entre as citocinas estudadas.

Balanco das citocinas



Esquema 02 –Balanço das citocinas nos estágios clínicos mínimo e avançado da tuberculose pulmonar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, J. A.; HART, P.D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infect with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual non fusion pattern and observations on bacterial survival. **J. Exp. Med.**, **142**: 1 - 16, 1975.
- BARNES, P.F.; ABRAMS, J.S.; LU, S.; SIELING, P.A.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Patterns of Cytokine Production by Mycobacterium-Reactive Human T-Cell Clones. **Infect. Immun.**, **61**: 197-203, 1993.
- BARNES, P.F.; MODLIN, R.L.; ELLNER, J.J. T-Cell Responses and Cytokines. In: BLOOM, B.R. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and control*. Washington: ASM Press, 1994. Cap.25. p.417-36.
- BELLAMY, R. Genetics and pulmonary medicine. 3. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax.**, **53** : 588 - 93, 1998.
- BERMUDEZ, L.E. & KAPLAN, G. Recombinant cytokines for controlling mycobacterial infections. **Trends Microbiol.**, **3**: 22-6, 1995.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor . **N. Engl. J. Med.**, **316**: 379 - 85, 1987.
- BLACK, C.M.; CATTERALL, J.R.; REMINGTON, J.S. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. **J. Immunol.**, **138**: 491-95, 1987.
- BOOM, W. H.; WALLIS, R. S.; CHEVENAK, K. A. Human *Mycobacterium tuberculosis* - reactive CD4+ T - cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, **59** : 2737 - 43, 1991.
- CHIU, S.S.; CHEUNG, C. Y.; PEIRIS, M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 in childhood: serology, polymerase chain reaction, and load. **J. Infect. Dis.**, **178**: 1250-6, 1998.
- Classification of Pulmonary Tuberculosis. In: *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis*. **Am Rev. Resp. Dis.**, **123**: 343-58, 1981
- COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFIN, J.P.; RUSSELL, D.G.; ORME, I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, **178**: 2243-47, 1993.
- COOPER, A.M. & FLYNN, J.L. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**: 512-16, 1995.

- DAHL, K.E.; SHIRATSUCHI, H.; HAMILTON, B.D.; ELLNER, J.; TOOSI, Z. Selective Induction of Transforming Growth Factor β in Human Monocytes by Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, **64**: 399-405, 1996.
- D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, **178**:1041-48, 1993.
- DANNENBERG JUNIOR, A.M. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. v.12: **228-33**, ano1991
- DEL PRETE, G.; DE CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J. Immunol.**, **150**: 353-60, 1993.
- DING, L. & SHEVACH, E.M. IL-10 Inhibits Mitogen-Induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J. Immunol.**, **148**: 3133-39, 1992.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141**: 2407 - 12, 1998.
- DOLIN, P.J.; RAVIGLIONE, M.C.; KOCHI, A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. **Bull. World Health Organ.**, **72**: 213-20, 1994.
- DONNELLY, R.P.; FREEMAN, S.L.; HAYES, M.P. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNE-alpha in human monocytes. **J. Immunol.**, **155**: 1420-27, 1995.
- FENTON, M.J. & VERMEULEN, M.W. Minireview. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. **Infect. Immun.**, **64**: 683-90, 1996.
- FENTON, M.J.; VERMEULEN, M.W.; KIM, S.; BURDICK, M.; STRIETER, R.M.; KORNFELD, H. Induction of Gamma Interferon Production in Human Alveolar Macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, **65**: 5149-56, 1997.
- FIorentino, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, **147**: 3815-22, 1991.
- FLESH, I.E.A. & LOUFMANN, S.H.E. Activation of tuberculostatic macrophage function by IFN- γ IL-4 and TNF- α . **Infect. Immun.**, **58**: 2675-77, 1990.

- GERHARDT FILHO, G. & HIJJAR, M.A. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. **J. Pneumol.**, **19**: 4-10, 1993.
- HAANEN, J.B.A.G.; MALEFIJT, R. W.; RES, P.C.M.; KRAAKMAN, E.M.; OTTENHOFF, T.H.M.; VRIES, R.R.P.; SPITS, H. Selection of a Human T Helper Type 1-like T Cell subset by Mycobacteria. **J. Exp. Med.**, **174**: 583-92, 1991.
- HASLETT, P.A.J.; HEMPSTEAD, M.; SEIDMAN, C.; DIAKUN, J.; VASQUEZ, D.; FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G. The Metabolic and Immunologic Effects of Short-Term Thalidomide Treatment of Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. **Aids Res. Human Retroviruses**, **13**: 1047-54, 1997.
- HASLETT, P.A.J.; CORRAL, L.G.; ALBERT, M. Thalidomide Costimulates Primary Human T Lymphocytes, Preferentially Inducing Proliferation, Cytokine Production, and Cytotoxic Responses in the CD⁺ Subset. **J. Exp. Med.**, **187**: 1885-92, 1998.
- HERNANDEZ-PANDO, R. & ROOK, G.A.W. The role of TNF- α in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. **Immunology.**, **82**: 591-95, 1994.
- HIRSCH, C.S.; HUSSAIN, R.; DOWOOD, G.; SHAHID, F.; ELLNER, J.J. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis of antigen - driven blastogenesis and interferon gamma production. **Proc. Natl. Acad. USA.**, **93**: 3193 - 8, 1996.
- HO, J.L. & RILEY, L.W. Defenses Against Tuberculosis. In: CRYSTAL, R.G.; WEST J.B. *The Lung: Scientific Foundations*. 2.ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. Cap. 183. p.2381-94.
- HUSSAIN, R.; DAWOOD, G.; ABRAR, N.; TOOSI, Z.; MINAI, A.; DOJKI, M.; ELLNER, J. J. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, **2** : 726 - 32, 1995.
- JEWETT, A.; CAVALCANTI, M.; BONAVIDA, B. Pivotal Role of Endogenous TNF- α in the Induction of Functional Inactivation and Apoptosis in NK Cells. **J. Immunol.**, **159**: 4815-22, 1997.
- JOHNSON, B.J. & McMURRAY, D. N. cytokine gene expression by cultures of human lymphocytes with autologus *Mycobacterium tuberculosis* - infected monocytes. **Infect. Immun.**, **62**: 1444-1450, 1994.
- JUFFERMANS, N.P.; VERBON, A.; DEVENTER, S.J.H. van; DEUTEKOM, H. van; SPEELMAN, D.P.; POLL, T. van der Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Inhibitors as Markers of Disease Activity of Tuberculosis. **Am. Resp. Crit. Care Med.**, **157**:1328-31, 1998.

- KAPLAN, G. Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. **Immunobiology**, 191: 564-68, 1994.
- KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunol. Tod.**, 16: 338-42, 1995.
- KINDLER, V.; SAPPINO, A.P.; GRAN, G.E.; PIGUET, P.F.; VASSALI, P. The inducing role of TNF in the development of bacterial granulomas during BCG infection. **Cell**, 56: 131-40, 1989.
- KOBZIK, L. & SCHOEN, F.J. The Lung. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. Cap 15, 699-704.
- LEAKE, E. S.; MYRVIK, Q. N.; WRIGHT, M. J. Phagosomal membranes of *Mycobacterium bovis* BCH - immune alveolar macrophages are resistant to disruption by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Infect. Immun.** 45: 443 - 6, 1984.
- MARINO, M.W.; DUNN, A.; GRAIL, D.; INGLESE, M.; NOGUCHI, Y.; RICHARDS, E.; JUNGBLUTH, A.; WADA, H.; MOORE, M.; WILLIAMSON, B.; BASU, S.; OLD, L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94: 8093-98, 1997.
- MENDEZ-SAMPERIO, P.; GONZALEZ-GARCIA, L.; PINEDA-FRAGOSO, P.R.; RAMOS-SANCHEZ, E. Specificity of T Cells in Human Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Cell. Immunol.**, 162: 194-201, 1995.
- MORENO, C.; MEHLERT, A.; LAMB, J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. **Clinical Exp. Immunol.**, 74: 206 - 10, 1988
- MURRAY, C.J.L. & LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 349:1498-504,1997.
- MURRAY, C.J.L. & LOPEZ, A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 349:1436-42, 1997.
- MURRAY, P.J.; WANG, L.; ONUFRYK, C.; TEPPER, R.I.; YOUN, R.A. T-cell derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. **J. Immunol.**, 158: 315-21, 1997.
- OGAWA, T.; UCHIDA, H. KUSOMOTO, 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 - 5, 1991.

- PALLADINO, M. A.; MORRIS, R. E.; STARNES, H. F.; LEVINSON, A. D. The transforming growth factor-betas. **Ann N Y Acad Sci.**, **593** : 181 - 7, 1990.
- PARRISH, N.M.; DICK, J.D.; BISHAI, W.R. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.**, **6** :107-112, 1998.
- PRINS, J. M.; LAUW, F.N.; DERKX, B. H.; SPEELMANN, P.; KUIJPER, E. J.; DEVENTER, S. J. Van. Endotoxin release and cytokine production in acute and chronic meningococcaemia. **Clin. Exp. Immunol.**, **114**: 215-9, 1998.
- ROBINSON, D.S.; YING, S.; TAYLOR, I.K.; WANGOO, A.; MITCHELL, D.M.; KAY, A.B.; HAMID, Q.; SHAW, R.J. Evidence for a TH1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gamma gene activation in pulmonary tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **149**: 989-993, 1994.
- SIFFORD, M. & BATES, J.H. Host Determinants of Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*. **Semin. Resp. Infect.**, **6**: 44-50, 1991.
- SILVER, R. F.; LI, Q.; ELLNER, J.J. Expression of Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human Monocytes: Virulence Correlates with Intracellular Growth and Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha but not with Evasion of Lymphocyte-Dependent Monocyte Effector Functions. **Infect. Immun.**, **66**: 1190-99, 1998.
- SMITH, D.; HANSCH, H.; BANCROFT, G.; EHLERS, S. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. **Immunology**, **92**: 413-21, 1997.
- SODHI, A.; GONG, J.-H.; SILVA, C.; QIAN, D.; BARNES, P.F. Clinical Correlates of Interferon γ Production in Patients with Tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.**, **25**: 617-20, 1997.
- TAHA, R.A.; KOTSIMBOS, T.C.; SONG, Y.L.; MENZIES, D.; HAMID, Q. IFN-gama and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **155**: 1135-39, 1997.
- TAKASHIMA, T. UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis - **Infect. Immun.**, **58** : 3286 - 92, 1990.
- TOOSI, Z.; HAMILTON, B.D.; PHILLIPS, M.H.; AVERILL, L.E.; ELLNER, J.J.; SALVEKAR, A. Regulation of Nuclear Factor- κ B and its inhibitor I κ B- α /MAD-3 in Monocytes by *Mycobacterium tuberculosis* and During Human Tuberculosis. **J. Immunol.**, **159**: 4109-16, 1997.
- VALONE, S. E.; RICH, E. A.; WALLIS, R. S.; ELLNER, J.J. Expression of tumor necrosis factor *in vitro* by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. **Infect Immun.**, **56**: 3313-3315, 1988.

YANG, J.; MITSUYAMA, M. An essential role for endogenous interferon- gamma in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. **Immunology.**, **91** : 529 - 35, 1998.

ZHANG, M.; LIN, Y.; IYER, D.V.; GONG, J.; ABRAMS, J.S.; BARNES, P.F. T-Cell Cytokine Resonances in Human Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, **63**: 3231-34, 1995.

9. ANEXOS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO PELA IDADE E SEXO DOS PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO RADIOLÓGICA DA ATS.

CLASSIFICAÇÃO	IDADE	SEXO	
	ME DIA \pm DP	MASCULINO	FEMININO
MÍNIMA	48 \pm 12,5	4	4
MODERADA	29 \pm 16,7	4	4
AVANÇADA	42 \pm 14,2	7	0

TABELA 2: ACHADOS HEMATOLÓGICOS NOS PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR, SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO RADIOLÓGICA DA ATS.

Classificação	Hematócrito %	Hemoglobina g/dl	Plaquetas K/ μ l	Leucócitos totais Mm ³	Linfócitos %	Monócitos %	Ganulócitos %
Mínima	33,9 \pm 7,2	10,5 \pm 2,2	384,8 \pm 120,2	8,6 \pm 3,5	30,1 \pm 14,9	12,4 \pm 7,9	57,4 \pm 21,7
Moderada	36,7 \pm 6,5	11,3 \pm 2,2	360,5 \pm 143,8	8,6 \pm 3,0	31,0 \pm 14,6	10,2 \pm 6,7	57,8 \pm 16,5
Avançada	35,6 \pm 8,5	11,1 \pm 2,9	337,0 \pm 139,0	12,7 \pm 5,6	27,8 \pm 14,5	13,4 \pm 4,8	58,7 \pm 16,5

IMUNO-REGULAÇÃO POR CITOCINAS NA TUBERCULOSE PULMONAR HUMANA AVALIAÇÃO PELA TÉCNICA DE SANGUE TOTAL.

TABELA 1 - ESTÁGIO MÍNIMO

PACIENTE	IFN γ - MEIO	IFN γ - PPD	IFN γ - MTB	TNF α MEIO	TNF α PPD	TNF α MTB	IL 10 MEIO	IL 10 PPD	IL10 MTB
H. S.	0.0	937.4	642.3	0.0	46.58	221.5	3.77	16.24	0.0
R. M.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	84.86	4.8	23.25	17.12
A. B	0.0	1054.0	1062.0	0.0	362.9	580.3	8.1	0.0	28.9
F. S	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.8	36.3	35.5
A. C	0.0	13.74	58.11	0.0	0.0	61.65	6.1	12.6	24.8
A. S.	0.0	861.0	945.5	0.0	29.56	94.87	4.93	18.57	4.35
R.G.	0.0	1142.0	915.8	0.0	59.99	96.09	7.3	25.3	4.35
MEDIANA	0.0	861.0	642.0	0.0	30.0	95.0	6.1	19.0	25.0
MÉDIA \pm DP	0.0	572.6 \pm 538.5	517.7 \pm 483.2	0.0	71.4 \pm 130.9	162.9 \pm 195.5	6.4 \pm 2.1	18.8 \pm 11.16	20.0 \pm 13.5

TABELA 2 - ESTÁGIO MODERADO

PACIENTE	IFN γ - MEIO	IFN γ - PPD	IFN γ - MTB	TNF α MEIO	TNF α PPD	TNF α MTB	IL 10 MEIO	IL 10 PPD	IL10 MTB
E.M.	0.0	0.0	0.0	0.0	248.0	420.9	0.0	30.46	1.74
E. J.	0.0	0.0	0.0	0.0	1.79	5.54	3.6	18.76	16.3
T. A.	0.0	408.8	316.8	0.0	104.0	158.8	0.7	6.9	50.0
M. B.	0.0	11.77	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	8.9	11.4
M. N.	0.0	797.5	212.9	0.0	52.94	109.8	6.5	11.8	22.0
J. J.	0.0	1933.0	25.58	0.0	300.7	9.0	79.1	118.8	97.5
A. M.	0.0	100.3	0.0	0.0	27.81	8.04	4.8	23.2	17.1
C. L.	0.0	549.1	459.4	0.0	87.80	120.2	4.4	11.4	23.6
MEDIANA	0.0	254.5	13.0	0.0	70.5	59.5	4.0	15.5	19.5
MÉDIA \pm DP	0.0	482.6 \pm 678.7	126.3 \pm 179.3	0.0	103.0 \pm 113.0	104.1 \pm 142.7	12.8 \pm 26.8	28.8 \pm 37.3	30.0 \pm 30.78

TABELA 3 - ESTÁGIO AVANÇADO

PACIENTE	IFN γ - MEIO	IFN γ - PPD	IFN γ - MTB	TNF α MEIO	TNF α PPD	TNF α MTB	IL 10 MEIO	IL 10 PPD	IL10 MTB
D. P.	0.0	1072.0	949.2	0.0	235.5	412.7	19.44	75.12	1.16
J.S.	0.0	0.0	0.0	0.0	68.35	431.4	8.9	37.9	573.4
J. J.	0.0	445.8	213.8	10.04	451.5	479.2	32.20	49.02	3.77
J. R.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.29	3.48	9.86	2.32
A. J.	0.0	509.6	279.8	0.0	135.2	236.0	6.09	75.41	1.16
M. C.	0.0	0.0	188.6	0.0	0.0	81.16	13.0	13.8	104.1
J. V.	0.0	56.16	0.0	0.0	0.0	19.33	9.3	8.1	157.5
MEDIANA	0.0	56.0	189.0	0.0	68.0	236.0	9.3	38.0	4.0
MÉDIA \pm DP	0.0	297 \pm 406.4	233.1 \pm 336.7	1.4 \pm 3.7	127.3 \pm 168.0	237.4 \pm 205.7	13.2 \pm 9.8	38.4 \pm 29.2	120.4 \pm 209

TABELA 4 - DOSAGEM DE IFN- γ EM DOADORES SAUDÁVEIS – PPD+

DOADOR	MEIO	PPD	MTB
L. S.	0.0	1467	1245
L. L.	0.0	718.8	384.3
E. C.	0.0	1195	1222
J.O.	0.0	1208	910.5
J. A.	40.08	1096	1271
MEDIANA	0.0	1195	1222
MÉDIA \pm DP	8.0 \pm 17.9	1137 \pm 271.1	1007 \pm 377.4

TABELA 5 - DOSAGEM DE TNF- α EM DOADORES SAUDÁVEIS – PPD+

DOADOR	MEIO	PPD	MTB
L. S.	0.0	207.6	144.7
L. L.	0.0	0.0	41.15
E. C.	0.0	171.9	131.4
J.O.	0.0	45.58	19.54
MEDIANA	0.0	108.7	86.2
MÉDIA \pm DP	0.0	106.3 \pm 99.2	84.2 \pm 63.0

**IMUNO – REGULAÇÃO POR CITOCINAS NA TUBERCULOSE PULMONAR
HUMANA. TECNICA DE SANGUE TOTAL**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E CONSCIENTE

- A . Eu, _____,
Fui informado de que este estudo prevê a doação de sangue uma vez. O tratamento a que serei submetido será o convencional, sendo utilizado para casos deste tipo independente da participação deste estudo.
- B . Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão ajudar no futuro, outras pessoas com esta doença.
- C . O procedimento será o seguinte: doarei 3ml de sangue apenas uma vez.
- D. Os possíveis desconfortos e riscos inerentes a este procedimento são aqueles relacionados com a retirada de sangue venoso. Dor local, e, mais raramente infecção, podem ocorrer. Este é um procedimento médico de rotina e todos os cuidados apropriados serão tomados.
- E. Os resultados deste estudo serão discutidos comigo e considerados confidenciais. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos pacientes.
- F. Dr. _____, discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas. Se eu tiver novas perguntas, eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou entrar em contato com o responsável pelo estudo, Dr. Manoel Barral-Netto, pelo telefone 356 8782.
- G. Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para recusar participar no estudo, ou me retirar em qualquer época após o seu início, sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que devo receber.
- H. Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo (ou foi lido para mim).
- I. Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura: _____ RG n.º _____

Testemunha: _____ RG n.º _____

Médico assistente: _____

Data: ___/___/___