

Respostas das citocinas T 2 desencadeadas por *Mycobacterium tuberculosis* virulento nos doentes com tuberculose pulmonar em estado avançado

Type 2 cytokine responses elicited by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in advanced tuberculosis patients

DIANE J. ORDWAY¹, MARIA J. ARROZ², MÓNICA S. FREIRE³, HAZEL M. DOCKRELL⁴, FERNANDO A. VENTURA⁵

¹ Doutorada e Investigadora no projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.

² Assistente Hospitalar Graduada de Patologia Clínica; Responsável pelo Laboratório de Hematologia e de Citometria de Fluxo do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz, Rua da Junqueira 126, 1349-019 Lisboa, Portugal; Assistente Convidada de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

³ Estudante do último ano de Engenharia Biotecnológica e Bolseira do projecto de investigação denominado "Eurostandards", financiado pela União Europeia, Hospital Egas Moniz, Rua da Junqueira 126, 1349-019 Lisboa, Portugal, e no Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal.

⁴ Assistente na Unidade de Imunologia da *London School of Hygiene & Tropical Medicine, Department of Infectious and Tropical Medicine, Immunology Unit, Keppel Street*, London, WC1E 7HT, UK.

⁵ Coordenador da Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA, Palácio Bensaúde Estrada da Luz, 153, 1600 Lisboa, Portugal; Responsável do projecto de Investigação em Imunologia das Micobactérias, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira, 96, 1349-008 Lisboa, Portugal; Assistente Hospitalar de Infecçiology, Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Hospital Egas Moniz, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal; Professor Regente da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Recebido para publicação: 01.02.7

Aceite para publicação: 01.03.5

RESUMO

Avaliaram-se *in vitro* as respostas das citocinas Tipo 1 e Tipo 2 de doadores portugueses saudáveis vacinados à nascença com BCG, com Mantoux positivo (induração ≥ 5 mm) e de doentes com tuberculose pulmonar (TP). Foi efectuado o estudo por ELISA da produção de IFN- γ e IL-5 por Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) dos doadores após estimulação com *M. tuberculosis* e antígeno solúvel PPD. Foi confirmada a presença intracelular de IFN- γ e de IL-4 em subpopulações de células T por análise multiparamétrica, em citometria de fluxo. As CMSP dos doentes com tuberculose estimuladas com PPD e *M. tuberculosis* demonstraram uma diminuição na produção de IFN- γ sem aumento da produção de IL-5 em resposta ao painel de antígenos. Nos doentes com tuberculose observou-se uma frequência diminuída de IFN- γ intracelular nas células T CD4+ e CD8+, em comparação com os grupos controlos. Após estimulação das CMSP com *M. tuberculosis*, os doentes demonstraram um aumento médio de IL-4 intracelular no fenótipo T CD4+, mais evidente na subpopulação T CD8+. O aumento da secreção de IL-4 nos doentes com tuberculose verificou-se sobretudo nos indivíduos em estado avançado da doença. Os resultados obtidos por Citometria de Fluxo contradizem de alguma forma os obtidos por ELISA. A secreção de IL-4 intracelular representa uma medida mais sensível da produção de citocinas tipo 2 do que a quantificação de IL-5 por técnicas de ELISA. Estes novos resultados sugerem que pode ocorrer uma mudança de T 1 para T 2 em doentes com tuberculose em estado avançado.

REV PORT PNEUMOL 2001; VII (2):

Palavras-chave: Imunidade Celular, Tuberculose Pulmonar, Respostas de citocinas Tipo 1 e Tipo 2.

In vitro Type 1 and Type 2 cytokine responses were assessed in healthy Portuguese donors who were BCG vaccinated at birth and Mantoux positive (induration ≥ 5 mm) and pulmonary tuberculosis patients (TB). We evaluated the production of IFN- γ and IL-5, after PBMC from donors were stimulated with live *M. tuberculosis* H37Rv and the soluble antigen PPD, by standard ELISA techniques. These studies were extended to confirm intracellular presence of IFN- γ and IL-4 in specific T cell subsets by multi-parameter flow cytometry. PBMC from tuberculosis patients demonstrated significantly reduced amounts of IFN- γ when stimulated with PPD and *M. tuberculosis*, with no increase in IL-5 production towards all the antigens, when compared to the control group. Intracellular staining for IFN- γ in tuberculosis patients showed reduced frequencies of CD4+ and CD8+ T cell intracellular IFN- γ in comparison to healthy subjects. Tuberculosis patients demonstrated a mean increase of intracellular IL-4 after PBMC were stimulated with *M. tuberculosis* in the CD4+ phenotype, but more notably in the CD8+ subset. The increased secretion of IL-4 in tuberculosis patients was primarily in individuals with an advanced clinical form of the disease. Interestingly the findings using flow cytometry techniques somewhat contradicts the results obtained by ELISA. Intracellular IL-4 secretion is therefore a more sensitive measure of Type 2 cytokine production than quantitation of IL-5 by ELISA. These results suggest that a type 1 switch to a type 2 can occur, in patients with tuberculosis in an advanced stage.

REV PORT PNEUMOL 2001; VII (2):

Key-words: Cellular Immunity, Pulmonary tuberculosis, Type 1 and Type 2 Cytokine responses.

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

A dicotomia da produção de citocinas Tipo 1 e Tipo 2 tem sido descrita em diversas infecções, como um tipo de resposta conferindo protecção e outro estando associado a doença¹. As células Tipo 1 produzem IL-2, IFN- γ e linfotóxina além de outras citocinas, enquanto as células Tipo 2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, e outras citocinas mas não produzem IL-2 ou IFN- γ ². Tem sido descrito que as células T humanas reactivas ao *M. tuberculosis* produzem uma extensa variedade de citocinas, incluindo IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10³. Estudos demonstraram que depois das CMSP dos doentes com tuberculose serem estimuladas com *M. tuberculosis*, o IFN- γ diminui, não havendo contudo um aumento sistémico de IL-4 ou no local da infecção ou em reacção à tuberculina, quando comparado com dadores saudáveis⁴. No entanto, estudos mais recentes demonstraram que quando as CMSP de pacientes com tuberculose eram estimuladas com *M. tuberculosis* H37Ra, as células T CD8⁺ demonstravam um aumento da produção de IL-4⁵. Estes resultados contraditórios podem ser devidos a métodos experimentais diferentes, efeitos das condições da cultura *in vitro* e com maior probabilidade podem reflectir diferenças no estadio da doença e a patologia pulmonar dos doentes com tuberculose.

As células T podem produzir citocinas, as quais podem causar a activação de macrófagos, resultando na morte intracelular de micobactéria ou na imunossupressão das respostas imunitárias protectoras. Os indivíduos com determinado receptor para o IFN- γ (IFN- γ R1) devido a uma deficiência na mutação da cadeia de ligação de alta afinidade deste receptor demonstram uma maior susceptibilidade a infecções micobacteriais fatais⁶. Os doentes com doença granulomatosa crónica demonstraram uma incidência reduzida de infecções bacterianas quando foi administrado IFN- γ , embora a estimulação de fagocitos *in vitro* não tenha demonstrado aumento dos efeitos antibacterianos⁷. Estes resultados sugerem que as células Tipo 1 desempenham um papel importante nas defesas humanas antimicobacterianas. As células Tipo 2 produzem IL-4 a qual tem a capacidade de inibir a resposta

imunitária através da desactivação de macrófagos⁸ e através da diminuição da expressão do receptor da IL-2 reduzindo assim a proliferação de células T⁹. Um balanço crítico entre a inibição e a estimulação da produção de citocinas pode ser importante no ambiente local, para promover um claro efeito antibacteriano. No entanto, no caso da tuberculose, pode ocorrer um desequilíbrio no perfil das citocinas Tipo 1 ou Tipo 2 conduzindo à imunossupressão e à doença.

A maioria dos dados não suporta mudança de Tipo 1 para Tipo 2 nas infecções tuberculosas^{4,10,11,12}, embora esses estudos tenham sido geograficamente localizados em países com baixa incidência dessa mesma infecção. Por sua vez, os dados que suportam um desvio de Tipo 1 para Tipo 2 provêm de países endémicos para a doença^{5,13}.

Neste estudo foi nosso objectivo avaliar as respostas das citocinas Tipo 1 e Tipo 2 nas CMSP de doentes infectados com tuberculose pulmonar, e de dadores saudáveis vacinados com BCG, após a estimulação com derivado de proteína purificada (PPD) e com *Mycobacterium tuberculosis* virulento. O estudo presente demonstra que em comparação com as CMSP dos dadores saudáveis, as CMSP dos doentes com tuberculose quando são estimuladas com *M. tuberculosis* mostram uma redução da secreção de IFN- γ . Estes estudos confirmam que, quando se utilizam técnicas de ELISA, as células de doentes com tuberculose não demonstram diferença significativa quando comparadas com as de dadores saudáveis no que diz respeito à produção de IL-5. No entanto, utilizando técnicas de citometria de fluxo verificou-se um aumento intracelular de IL-4 nos doentes com tuberculose em estado avançado da doença, sendo este aumento mais significativo nas células T CD8⁺. Embora possa ocorrer redução na produção de citocinas Tipo 1 na ausência de uma mudança completa para a activação Tipo 2, apresentamos dados de uma activação específica das células produtoras de citocinas Tipo 2 ao serem utilizados métodos de detecção sensíveis. O presente estudo apresenta dados que suportam a supressão derivada da redução de IFN- γ e de um aumento de IL-4 em formas avançadas da infecção tuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos

Foram recrutados para este estudo portugueses saudáveis vacinados com BCG, e com Mantoux positivo (induração ≥ 5 mm) residentes em Lisboa, Portugal. Os indivíduos incluídos neste estudo tinham idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos (idade média, 30.1 anos). Todos os doadores (100%) tinham sido vacinados à nascença com o bacilo *M. bovis* Calmette-Guerin (BCG), apresentavam um teste cutâneo de Mantoux positivo, mas não tinham história prévia de TP. Os doadores saudáveis eram seronegativos para a infecção VIH-1 e VIH-2 por testes de ELISA, confirmados por Western blot.

Os pacientes portugueses com tuberculose pulmonar activa com doença cavitada foram recrutados do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, do Serviço de Pneumologia e do Serviço de Medicina II do Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal; Serviço de Pneumologia IV do Hospital Pulido Valente, Lisboa, Portugal; e do Hospital Dr. José Maria Antunes Junior, Torres Vedras, Portugal. Os indivíduos incluídos neste estudo tinham idades compreendidas entre os 20 e os 60 anos (idade média, 35.1 anos), e a maioria (85%) tinha sido vacinada com *M. bovis* (BCG).

Os pacientes com tuberculose pulmonar com doença cavitada, seronegativos para a infecção VIH-1 e 2 foram diagnosticados pela apresentação clínica, por radiografia do tórax e confirmados por exame directo e/ou cultura de expectoração, secreções brônquicas ou lavado bronco-alveolar. A maioria dos doentes eram novos casos de tuberculose sem nenhuma terapêutica prévia ou, que tinham no máximo sete dias de terapêutica de acordo com as recomendações OMS (terapêutica diária com isoniazida, rifampicina, etambutol, e pirazinamida). Os doentes com tuberculose foram posteriormente subdivididos de acordo com estadio moderado ou avançado da doença. A divisão dos subgrupos foi baseada na avaliação qualitativa de bacilos ácido-alcool resistentes em esfregaços de expectoração (+, +++) e na avaliação clínica da localização superior e inferior das cavita-

ções nas radiografias de tórax. Os estudos foram baseados na capacidade das CMSP dos doentes com tuberculose para produzirem IFN- γ e IL-5, antes do tratamento ser iniciado e cinco dias depois do começo do tratamento; não se verificaram diferenças estatísticas na capacidade de resposta dos doentes (dados não mostrados).

Antigénios

PPD, lote RT44, foi adquirida ao *Statens Serum-institute* (Copenhaga, Dinamarca) e usado numa concentração final de 10 μ g/ml. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb), foi cedido pelo Dr. D. Smith, (*London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, U.K*) e usado a uma unidade formadora de colónia (ufc) por macrófago infectado. Os antigénios foram todos testados com a finalidade de se determinar a concentração óptima para uso. O mitogénio fitohemaglutinina (PHA), (*Difco, Michigan, U.S.A.*) foi utilizado como controlo positivo na concentração final de 8 μ g/ml (dados não mostrados).

Bactérias

Mycobacterium tuberculosis H37Rv cresceu em caldo 7H9 enriquecido com glicerol e ADC (*Bacto; Difco, Michigan, U.S.A.*). As culturas desenvolveram-se a 37°C em agitador orbital de fase midlogaritmica, sendo depois alicutadas e congeladas a -70°C. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi utilizado a 1 unidade formadora de colónia (ufc) por macrófago infectado.

Ensaio de Citocinas

A quantidade de IFN- γ ou IL-5 presentes na cultura foi analisada por testes comerciais de ELISA (*Endogen, Woburn, MA, U.S.A.*). Os sobrenadantes foram recolhidos para placas paralelas no dia 6, armazenados a -20°C e analisados mais tarde de acordo com as instruções do fabricante (*Endogen,*

Woburn, MA, U.S.A.).

Avaliação intracelular de citocinas

A presença de IFN- γ e de IL-4 foi analisada utilizando um reagente comercial, *IS Ultra cell-Fix Perm Kit* (Immune Source, CA, U.S.A.). Resumidamente, o protocolo para detectar a presença de citocinas intracelulares em células T, consistiu na adição de 1×10^6 CMSP ou 100 μ l de sangue total a cada um dos tubos, 40 μ l de tampão (Azida de sódio a 1%, albumina sérica bovina a 2% (ASB) em tampão salino de fosfato (PBS)) e 10 μ l do anticorpo monoclonal de superfície adequado, ou de controlo isótipo, em incubação a 4°C durante 30 minutos no escuro. As CMSP são depois lavadas 2 vezes com tampão (200 μ l/tubo) e fixadas com 100 μ l de tampão fixador (paraformaldeído a 4%) durante 20 minutos. As CMSP são então 2 vezes lavadas com 200 μ l de tampão de lavagem/permeabilizante e ressuspensas em 50 μ l de tampão lavagem/permeabilizante e 5 μ l de anticorpo monoclonal anti-citocina intracelular ou de controlo isótipo intracelular da *PharMingen* (PharMingen, CA, U.S.A.), deixando-se a incubar durante 30 minutos a 4°C no escuro. As CMSP foram então lavadas 2 vezes com tampão e adquiridas no citometro de fluxo *FACSCalibur* (Becton Dickinson, CA, U.S.A.).

Para se identificarem os linfócitos foram utilizados parâmetros de luz dispersa. A fluorescência foi analisada através de uma janela obtida incluindo todos os linfócitos, medindo a intensidade de fluorescência após excitação de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), conjugado de Cy5--ficoeritrina (CyP⁵), proteína de clorofila peridimina (PerCP) e aloficocianina (APC).

Análise estatística

Os dados são apresentados utilizando valores médios de amostras e ensaios em duplicado. Foi utilizado um método não paramétrico, teste Mann-Whitney U, o qual não faz suposições sobre a distribuição subjacente. A normalidade dos dados foi

usada para estabelecer significância estatística entre grupos de dados. As correlações entre conjuntos de dados foram calculadas através do uso do teste de correlação de Spearman. A variância dos dados foi estabelecida através do uso do desvio padrão.

RESULTADOS

Produção de IFN- γ em resposta a antígenos micobacterianos

Foram estabelecidas respostas *in vitro*, referentes a dadores portugueses saudáveis vacinados à nascença com BCG, com Mantoux positivo (induração ≥ 5 mm), e em doentes com tuberculose pulmonar. Foram avaliadas as respostas a *M. tuberculosis* H37Rv e ao antígeno solúvel PPD, uma preparação altamente processada de antígenos de *M. tuberculosis*. O mitogénio PHA foi utilizado como controlo positivo nas culturas. O nível de IFN- γ foi medido no sobrenadante das culturas de CMSP estimuladas com os antígenos micobacterianos.

Dadores saudáveis vacinados com BCG

Vinte dadores controlo foram avaliados na produção de IFN- γ . As duas preparações, PPD e *M. tuberculosis* foram capazes de induzir a produção de IFN- γ em dadores saudáveis (n=20) (Fig. 1a). A produção de IFN- γ foi mais elevada em relação ao estímulo com PPD, seguida de *M. tuberculosis* vivo. A produção de IFN- γ também resultou numa diferença estatística significativa (Mann-Whitney U test, p=0.000) entre as respostas evocadas por cada preparação. Foi evidente a variação entre a capacidade individual para produzir IFN- γ das CMSP dos indivíduos dadores.

Pacientes com TB

Em pacientes com tuberculose, a produção de IFN- γ em resposta a um painel de antígenos é menor, quando comparada com a do grupo controlo

após estimulação com PPD e *M. tuberculosis* (Fig.1b). Quando comparado com a capacidade de produção de IFN- γ em CMSP de indivíduos saudáveis, as CMSP dos doentes com tuberculose verificam diminuições significativas das quantidades de IFN- γ quando estimuladas com PPD (Mann-Whitney U test, $p=0.010$) e *M. tuberculosis* (Mann-Whitney U test, $p=0.042$). O baixo nível de produção de IFN- γ pode ser devido a uma ausência de células no sangue periférico, a uma redução de células específicas *M. tuberculosis* ou à incapacidade dessas células produzirem IFN- γ em resposta a estímulos.

Heterogeneidade das respostas em doentes com tuberculose

Nos dados demonstrados pelas respostas do IFN- γ é evidente que a habilidade das CMSP de secretar citocinas, é extremamente heterogênea em resposta a todos os antigénios. Os doentes com tuberculose pulmonar com doença cavitada foram posteriormente classificados mediante o estado moderado ou avançado da doença de acordo com a carga bacteriana e as características clínicas. Não foram observadas quaisquer diferenças nas respostas dos doentes com tuberculose as quais pudessem ser correlacionadas com a duração (entre 0-7 dias) do tratamento anti-micobacteriano (dados não mostrados) e todos eles tinham sido vacinados com BCG. Os pacientes com tuberculose não foram testados com o teste cutâneo de Mantoux. A Fig. 2a demonstra as diferenças dentro do grupo de acordo com a gravidade da doença e o impacto do alcoolismo no estadió da doença (Fig. 2b). Foi evidente que a maioria dos doentes com doença moderada ($n=14$) induziram uma produção elevada de IFN- γ em resposta ao painel de antigénios. Estadios avançados da doença ($n=8$) demonstraram uma menor magnitude de respostas. O impacto do alcoolismo no estadió da doença causou a mais baixa das respostas ($n=9$) (Fig. 2b). Foi encontrada uma alta variabilidade em todas as respostas dos grupos dadores.

Produção de IL-5 em resposta a antigénios

micobacterianos

Foi medido simultâneamente com a proliferação de linfócitos, o nível de IL-5 no sobrenadante de culturas de CMSP estimuladas com antigénios micobacterianos.

Respostas das citocinas Tipo 1 e Tipo 2

Foram analisadas e comparadas as respostas Tipo 1 (IFN- γ) e Tipo 2 (IL-5) induzidas pelo painel de antigénios em doentes com tuberculose pulmonar e em dadores saudáveis. A produção de IL-5 foi ensaiada por técnicas de ELISA devido ao aumento da sua concentração no sobrenadante do ensaio. A citocina IL-4 devido à sua produção local célula a célula é uma medida mais exacta da resposta Tipo 2. No entanto, a IL-4 pode ser consumida nas culturas *in vitro* por outro tipo de células e é então mais difícil de detectar por ELISA. O aumento da produção de IL-4 indica normalmente, um aumento na produção de IL-5, à medida que estes genes são regulados de forma coordenada¹⁵. Não foram encontradas diferenças significativas na produção de IL-5 em qualquer dos grupos. As CMSP dos doentes com tuberculose, quando estimuladas (Tabela I) demonstram não existir nenhuma diferença estatística na produção de IL-5 perante qualquer dos antigénios, quando comparadas com as CMSP do grupo controlo. A produção de IFN- γ foi reduzida relativamente ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo, mas não se verificou qualquer aumento convincente na produção de IL-5 nos pacientes com tuberculose. Isto confirmou que não existe uma mudança de resposta Tipo 1 para Tipo 2 por parte dos dadores com tuberculose pulmonar, quando avaliados por técnicas de ELISA.

IFN- γ e IL-4 intracelular de células T na população estudada

A frequência de células T CD4+ e CD8+ com IFN- γ e IL-4 intracelular foi avaliada em resposta à estimulação com PPD, *M. tuberculosis*, e sem

estimulação, durante 6 dias, em indivíduos saudáveis e em doentes com tuberculose. A caracterização destes fenótipos de células T e das citocinas intracelulares foi efectuada por citometria de fluxo com análise multiparamétrica (4-fluocromos/tubo).

Em estudos anteriores, a produção de IFN- γ e IL-5 foi avaliada em CMSP, depois das mesmas serem estimuladas com o painel de antígenos, nos indivíduos em estudo. Apesar desta informação ter sido útil, foi impossível identificar fenótipos específicos de células T envolvidas na produção destas citocinas. Foram posteriormente utilizadas técnicas de citometria de fluxo com análise multiparamétrica para definir os fenótipos específicos de células T envolvidos na produção de IFN- γ e IL-4.

Indução com *M. tuberculosis* de IFN- γ e IL-4 intracelular em células T nos indivíduos em estudo

As CMSP dos indivíduos em estudo foram estimuladas durante 6 dias com PPD ou *M. tuberculosis* vivo, e avaliadas por citometria de fluxo, em relação à produção de IFN- γ e IL-4 intracelular, quando comparadas às células não estimuladas.

Depois da estimulação com PPD ou *M. tuberculosis*, as CMSP dos doentes saudáveis demonstraram a mais alta positividade média de IFN- γ no fenótipo CD4+ das células T, enquanto que depois da estimulação com *M. tuberculosis* vivo as células T CD8+ respondem de uma forma mais favorável (Fig. 3a). Doentes com tuberculose demonstraram frequências reduzidas de IFN- γ intracelular nas células T CD4+ e CD8+ (Mann-Whitney U test, $p=0.031$, $p=0.023$) em comparação com os indivíduos saudáveis.

Os pacientes com tuberculose demonstraram um aumento médio de IL-4 intracelular no fenótipo CD4+, depois das CMSP serem estimuladas com *M. tuberculosis* vivo, sendo esse aumento mais notório nas células T CD8+ (Fig. 3b). Interessante é o facto de as conclusões retiradas pelo uso de técnicas de citometria de fluxo contradizerem os resultados obtidos através de técnicas de ELISA, onde a produ-

ção de IL-5 não diferiu entre controlos saudáveis e doentes com tuberculose, o que sugeriu que não ocorria uma mudança para Tipo 2 da produção de citocinas. Os pacientes com tuberculose que demonstraram uma produção elevada de IL-4 tinham uma forma avançada da doença e eram alcoólicos crónicos (Fig. 3c).

DISCUSSÃO

Neste estudo a magnitude da produção de IFN- γ e IL-5 gerada por PPD e *M. tuberculosis* vivo, foi avaliada em controlos saudáveis e em doentes com tuberculose, através de duas técnicas, ELISA e citometria de fluxo. A relação entre a susceptibilidade dos indivíduos à tuberculose e a resposta imunitária do hospedeiro é pouco clara. Isto realça a importância de definir uma resposta imunitária humana saudável na população estudada. Após a infecção com *M. tuberculosis*, cerca de 5% dos indivíduos desenvolvem tuberculose progressiva e outros 5% adicionais demonstram reactivação posterior durante os primeiros dois anos. A avaliação da capacidade de resposta por parte dos doentes com tuberculose pulmonar ao *M. tuberculosis* virulento, pode contribuir para o esclarecimento sobre os factores envolvidos na imunossupressão que ocorre na doença. As comparações feitas entre doentes saudáveis e doentes com tuberculose podem também identificar funções imunitárias, as quais foram diferentes entre os grupos e que podem justificar a predisposição individual à tuberculose.

Os resultados deste estudo demonstram que as respostas do IFN- γ detectadas por ELISA, no grupo dos indivíduos saudáveis foram estatisticamente altas em presença de PPD e *M. tuberculosis* vivo, em comparação com as respostas dos doentes com tuberculose. A incapacidade dos doentes com tuberculose em produzirem IFN- γ na presença de PPD e *M. tuberculosis* fundamenta os dados obtidos noutros estudos, os quais demonstraram que, a produção de IFN- γ pelas CMSP, estimuladas com *M. tuberculosis* H37Rv ou estirpes Erdman, era reduzida quando comparada com a mesma produção por parte dos indivíduos saudáveis vacinados com BCG¹¹. A

incapacidade dos indivíduos com tuberculose activa em produzirem de forma adequada IFN- γ em resposta ao PPD e *M. tuberculosis*, pode ser devida à perturbação na apresentação do antígeno pelo macrófago e à activação de mediadores de supressão. Os estudos têm apontado o facto de as células T de memória e as células T não virgens proliferarem em resposta ao antígeno *M. tuberculosis* e produzirem IFN- γ ¹⁶, o que pode por seu lado, elevar a actividade antimicrobacteriana e a imunossupressão. Tem sido sugerido que a produção excessiva de TGF- β pode contribuir para reduzir a expressão do receptor da IL-12, resultando na produção reduzida de IFN- γ em doentes com tuberculose¹⁷.

O grupo dos doentes com tuberculose foi subdividido em formas moderada e avançada da doença, baseada em bacilos ácido-alcool nos esfregaços de expectoração dos doentes e nas zonas das cavitações do pulmão. Houve respostas consistentemente baixas de IFN- γ nos doentes com forma avançada da doença. Foi também interessante notar, que existia uma maior taxa de alcoolismo entre os pacientes com tuberculose avançada. As formas mais avançadas de tuberculose pode estar relacionada com o alcoolismo ou com os efeitos do álcool no sistema imunitário, condicionando nestes indivíduos uma maior vulnerabilidade na resposta à doença. Estudos prévios, descrevem *in vitro* depressão da função dos linfócitos T e uma diminuição das funções das células apresentadoras de antígeno, como uma consequência do consumo agudo e crónico de álcool nas defesas do hospedeiro^{18,19}.

Doentes com tuberculose pulmonar não demonstraram diferenças na produção de IL-5 quando analisados por ELISA e comparados com o grupo controlo. Estudos mostraram que em doentes com tuberculose, a produção de IFN- γ (Tipo 1) por CMSP estimuladas com *M. tuberculosis* H37Rv foi reduzida, comparada com a de indivíduos saudáveis vacinados com BCG¹¹. Esta depressão na expressão Tipo 1 não estava associada com um aumento da produção de IL-4 ou IL-10 (Tipo 2), a qual foi semelhante em pacientes com tuberculose e em

Tal como foi previamente discutido, os indivíduos estudados com infecção tuberculosa, demonstraram um decréscimo na produção de IFN- γ

doadores controlo. No entanto, outras experiências demonstraram que o número de células secretoras de IFN- γ não foi reduzido em doentes com tuberculose activa, e que a produção de IL-4 é mais frequente do que nos controlos^{13,14,20}. Foi também descrito que os doentes com tuberculose depois de estimulados com *M. tuberculosis* podem demonstrar um aumento na produção de IL-4 nas células T CD8+⁵.

A utilização de citometria de fluxo com análise multiparamétrica (“4-cores”), detecção de uma ou mais citocinas intracelulares em combinação com uma ou mais subpopulações de células T, definindo marcadores de fenotipagem, permite uma quantificação e caracterização das células T antígeno específicos. O uso de técnicas de ensaios de culturas, como as utilizadas nos ensaios de ELISA, nem sempre distinguem alterações na frequência de resposta, de alterações na intensidade de resposta.

Os resultados obtidos, neste estudo, por técnicas de ELISA demonstraram que as CMSP de alguns doadores saudáveis tinham capacidade aumentada de produzir IFN- γ em resposta à estimulação com *M. tuberculosis* vivo. Os dados referentes ao IFN- γ intracelular, analisados por citometria de fluxo, confirmaram que os doadores saudáveis vacinados com BCG exibem um valor médio maior de IFN- γ intracelular em células T com fenótipos CD4+ e CD8+ do que os doentes com tuberculose. Os doadores saudáveis demonstraram um aumento intracelular de IFN- γ nas células T com fenótipo CD4+ depois de serem estimuladas com PPD, enquanto que após estimulação com *M. tuberculosis* vivo as células T de fenótipo CD8+ demonstraram um aumento mais visível de IFN- γ intracelular. Estes resultados correspondem às expectativas uma vez que devido à capacidade de resposta das células T CD4+ aos epítomos do PPD solúvel processados e apresentados por células apresentadoras de antígeno no contexto de moléculas de MHC de classe II. As células T CD8+ reconhecem antígenos de *M. tuberculosis*, os quais foram processados e apresentados por moléculas MHC de classe I.

depois das CMSP serem estimuladas com *M. tuberculosis* vivo. As respostas das CMSP, depois de estimuladas com *M. tuberculosis* vivo, demonstraram

também que dentro do grupo de doentes com tuberculose existem bons e maus respondedores. Como tal, os indivíduos com tuberculose pulmonar com doença cavitada foram subdivididos em grupos moderados e avançados com base em esfregaços de expectoração e na avaliação clínica das cavitações dos lobos inferiores e superiores do pulmão. Tal como foi detectado por ELISA, os doentes em estado moderado exibiam um aumento na produção de IFN- γ em comparação com os doentes que apresentam extensas cavitações nos lobos inferiores do pulmão. Os resultados obtidos por citometria de fluxo, confirmaram este decréscimo de IFN- γ intracelular, depois das CMSP dos doentes com tuberculose serem estimuladas com *M. tuberculosis* vivo, o qual foi observado nas células T CD4+ e CD8+.

A produção de IL-5 pelas CMSP dos doentes com tuberculose depois de estimuladas com *M. tuberculosis* vivo foi avaliada por técnicas de ELISA. As CMSP, dos pacientes com tuberculose, estimuladas com *M. tuberculosis* não demonstraram diferença na produção de IL-5, em comparação com a dos dadores saudáveis. Avaliações posteriores através de citometria de fluxo demonstraram que, CMSP de indivíduos com tuberculose, estimuladas com *M. tuberculosis*, demonstravam um aumento de IL-4 intracelular nas células T de fenótipo CD8+, nos indivíduos com uma forma mais avançada da doença. Os doentes com tuberculose com alcoolismo crónico e cavitação nos lobos inferiores do pulmão compreendiam a maioria dos indivíduos com um aumento da resposta de IL-4 a *M. tuberculosis*.

A importância da patologia do pulmão é realçada pelo facto de indivíduos seropositivos para o VIH com co-infecção tuberculosa geralmente apresentarem infecção no lobo inferior. Estudos têm demonstrado que as CMSP de doentes com tuberculose depois de serem estimuladas com *M. tuberculosis* vivo apresentavam uma diminuição de IFN- γ e nenhum aumento de IL-4, não havendo contudo um aumento sistémico de IL-4 ou no local da infecção ou em reacção à tuberculina, quando comparado com dadores saudáveis. Estudos mais recentes demonstraram que quando as CMSP de doentes com tuberculose eram estimuladas com *M. tuberculosis*, as células T CD8+ demonstravam um aumento da produção de

IL-4⁵. É também interessante notar que a maioria dos estudos que suportam uma ausência de mudança de Tipo 1 para Tipo 2 em infecções tuberculosas são localizados geograficamente em países com uma incidência baixa por parte desta mesma infecção. Enquanto que os dados que suportam uma mudança de Tipo 1 para Tipo 2 provêm de países endémicos para a doença.

Nestes estudos, a imunossupressão presente nos doentes com tuberculose pode ser devida ao sequestro de antigénio específicos de células T do local da infecção no pulmão. Esta explicação pode ser responsável por algumas das respostas reduzidas apresentadas. Estes estudos apresentam dados os quais suportam a supressão derivada da redução de produção de IFN- γ com um aumento em IL-4 em alguns doentes, o que consistiu sobretudo em células T de fenótipo CD8+. Isto pode ser causado por uma apresentação defeituosa de antigénio por parte de monócitos infectados com *M. tuberculosis* ou por uma redução da função efectora das células.

Em conclusão, este estudo demonstra que os dadores saudáveis vacinados com BCG possuem uma resposta elevada de IFN- γ , detectada por técnicas de ELISA e de citometria de fluxo, ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo, comparada com a dos pacientes com tuberculose. Os doentes com tuberculose pulmonar demonstram uma redução significativa na capacidade de produzirem IFN- γ em resposta ao PPD e ao *M. tuberculosis*. Quando foram aplicadas técnicas de ELISA, o grupo de doentes com tuberculose não demonstrou nenhuma diferença significativa na produção de IL-5 em resposta ao painel de antigénios. No entanto, utilizando técnicas de citometria de fluxo, verificou-se um aumento de IL-4 intracelular nos doentes com tuberculose, com doença avançada, e este aumento foi mais frequente em células T de fenótipo CD8+. Isto sublinha que o método de ELISA demonstra sensibilidade reduzida na detecção de citocinas e que são necessárias técnicas mais específicas como a citometria de fluxo e técnicas que utilizam tetrameros para a avaliação da produção de citocinas após estimulação com antigénios específicos. Logo, apesar de poder ocorrer uma redução na produção de citocinas Tipo 1 na ausência de uma mudança total para a activação de

Tipo 2, existe alguma evidência na activação de células antigénio específicas, produtoras de citocinas Tipo 2, se se utilizarem métodos de detecção sensíveis.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Dr. D. Smith, de *London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK* por gentilmente fornecer o *M. tuberculosis* H37Rv. Gostaríamos de agradecer aos seguintes Serviços e pessoal médico por terem fornecido as amostras dos doentes: Dr. Kamal Mansinho (Director), Dr. Carlos Araujo, Prof. Jaime Nina e Dr. Fernando Borges do Serviço de Infecçiology e de Medicina Tropical e Dr. P. Abecassis (Director), Dr. José Pimenta da Graça, Dr^a. Silvia Sousa e Dr^a. Maria Francisca Moraes, do Serviço de Medicina II e Dr. A. Fernandes (Director), do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz, Lisboa; e Prof. Ramiro Goulart Ávila, Prof^a. Maria Jo_o Marques Gomes e Dr^a. Berta Mendes do Serviço de Pneumologia IV, Hospital Pulido Valente, Lisboa; Dr^a. Ana Barbado (Directora) e Dr^a. Natália André do Hospital Dr. José Maria Antunes Junior, Barro, Torres Vedras. Gostaríamos de agradecer _ nossa Instituição promotora Centro de Malaria e Outras Doenças Tropicais/Instituto de Higiene & Medicina Tropical (CMDT/IHMT) por providenciar apoio administrativo, o Departamento de Microbiologia do IHMT por providenciar apoio logístico laboratorial e ao Prof. J. Atouguia do Departamento de Clínica de Doenças Tropicais por providenciar um gabinete de trabalho. Este trabalho foi subsidiado por uma bolsa da Comissão Europeia (IC 18* CT 970236) e pela Comissão Nacional de Luta Contra a SIDA (001074). Diane Ordway teve uma bolsa para Doutoramento da PRAXIS XXIBD/9003/96.

BIBLIOGRAFIA

- MOSMANN TR, SAD S. The expanding universe of T-cell subsets, Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996; 17:138-146.
- JOHNSON BJ, MCMURRAY DN. Cytokine gene expression by culture of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infection and Immunity* 1994; 62:1444-1450.
- BARNES PF, LU S, ABRAMS JS, WANG G, YAMAMURA M. & MODLIN RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infection and Immunity* 1993b; 61:3482-3489.
- LIN Y, ZHANG M, HOFMAN FM, GONG J, BARNES P. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infection and Immunity* 1996; 64(4):1351-1456.
- SMITH SM, DOCKRELL HM. Role of CD8+ T cells in mycobacterial infections. *Immunology and cell Biology* 2000; 78:325-333.
- KUMARARATNE DS. Tuberculosis and immunodeficiency-of mice and men. *Clinical and Experimental Immunology* 1997; 80:314-323.
- INTERNATIONAL CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE COOPERATIVE STUDY. A controlled trial of interferon gamma to prevent infections in Chronic Granulomatous Disease. *New England Journal of Medicine* 1991; 324:509-516.
- HO LH, HE SH, RIOS MJC, WICK EA. Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte-monocyte colony stimulating factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. *Journal of Infectious Disease* 1992; 165:344-351.
- MARTINEZ OM, GIBBONS RS, GAROVOY MR, ARONSON FR. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2 dependant proliferation of human T cells. *Journal of Immunology* 1990; 144:2211-2215.
- VORA HDG, SAHA B, AGREWALA JN, MISHRA GC. Apoptosis of Th1-like cells in experimental tuberculosis (TB). *Clinical Experimental Immunology* 1999; 115: 324-328.
- ZHANG M, LIN Y, IYER DV, GONG J, ABRAMS JS, BARNES PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 1995; 63:3231-3234.
- SÁNCHEZ FO, RODRÍGUEZ JI, AGUDELO G, GARCIA LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infection and Immunity* 1994; 62:5673-5678.
- VAN CREVAL R, KARYADI E, PREYERS F. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *Journal of Infectious Disease* 2000; 181:1194-1197.
- BHATTACHARYYA S, SINGLA R, DEY AB, PRASAD H K. Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis. *Infection and Immunity*; 67(11):5597-5603.
- LOOTS GG, LOCKSLEY RM, BLANKESPOOR CM, WANG ZE, MILLER W, RUBIN EM, FRAZER KA. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13 and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 2000; 288:136-140.
- BARNES PF, MODLIN RL. Human cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1996, 215:297-319.
- ZHANG M, GONG J, PRESKY DH, XUE W & Barnes P. Expression of IL-12 receptor B1 and B2 subunits in human tuberculosis. *The Journal of Immunology* 1999, 162:2441-2447.
- GREIG JE, KEAST D, PALMER TN. Osmotic effects of ethanol on lymphocytes. *Addiction Biology* 2000, 5 (1):77-89.
- SZABO G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol and Alcoholism* 1999, 34 (6):830-841.

20 SURCEL HM, TROY-BLOMBERG M, PORCELLI S, ANDERSON 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* 1994, 81:171-176.

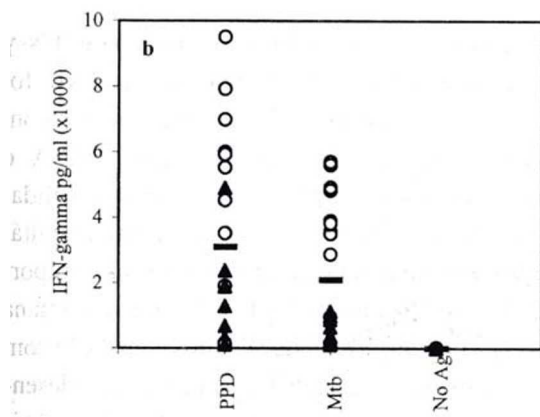


Fig. 2 - Heterogeneidade nas respostas dos doentes com tuberculose. As CMSP dos doentes com tuberculose foram incubadas com *M. tuberculosis* vivo, PPD e sem antígeno (No Ag) durante 7 dias, e a determinação de IFN- γ foi avaliada por técnicas de ELISA. Os valores das células não estimuladas foram sempre <12 pg/ml. As CMSP dos doentes com tuberculose foram estimuladas com *M. tuberculosis* vivo e caracterizadas consoante o estadio moderado (n=14), ou avançado (n=8) da doença (Fig. 2a) e como sendo alcoólicos (Δ) (n=9) ou não alcoólicos(o) (n=18) (Fig. 2b)

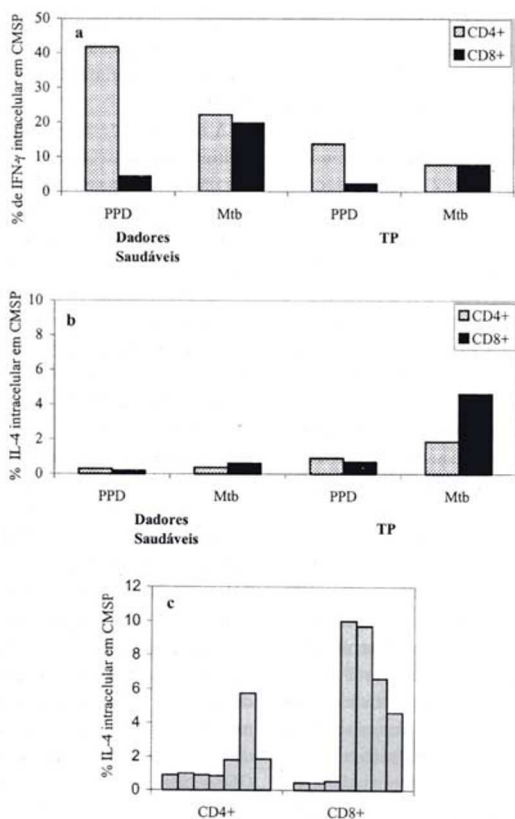


Fig. 3 - IFN- γ e IL-4 intracelulares de subpopulações de células T nas subpopulações estudadas. O valor médio das CMSP dos dadores saudáveis (n=12), e dos doentes com tuberculose (n=6) estimulados durante 6 dias com PPD, *M. tuberculosis* vivo ou incubado sem antígeno. Cada população foi avaliada consoante a expressão nas células T dos marcadores de superfície CD4 e CD8 em combinação com IFN- γ (Fig. 3a) e IL-4 (Fig. 3b) intracelular. A indução de IL-4 nos doentes com tuberculose através da estimulação com *M. tuberculosis* é demonstrada na Fig. 3c. As células não estimuladas demonstraram uma presença reduzida de IFN- γ e IL-4 com um valor positivo <0.027% para ambas as citocinas intracelulares

TABELA I

Respostas de IL-5 em controlos e em doentes com tuberculose pulmonar

	IL5 (pg/ml)	
	PPD	Mtb
Dadores	151.4 ±	46.18 ±
Saudáveis (n = 20)	94.89	24.42
Doentes com	135.22 ±	70.62 ±
TP (n = 22)	178.69	88.73

As CMSP foram estimuladas com PPD e *M. tuberculosis* vivo durante 7 dias. Os valores para a produção de IL-5 (pg/ml) referentes a cada grupo est_0 representados pela média ± desvio padr_0