

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

Perfis linfocitários Th1/Th2 e patogenia da co-infecção tuberculose/SIDA

Th1/Th2 lymphocytic profiles in pathogenic evolution of the co-infection tuberculosis/AIDS

MARQUES MAT¹, BAGANHA MF², MOTA PINTO A³, VERA L.⁴, MESQUITA L.⁵, ROBALO CORDEIRO C⁶, CORTE REAL R⁷, BOTELHO MF³, SANTOS ROSA MA³, MELIÇO SILVESTRE A⁸.

Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra (Fundação para a Ciência e Tecnologia)

RESUMO

Em estudos anteriores, pudemos constatar que nos indivíduos VIH negativos a gravidade da tuberculose pulmonar (TP) era modulada pelos perfis linfocitários Th1/Th2 nas áreas lesadas: predominância de Th1 ($30.9 \pm 14.3/24.3 \pm 9.7\%$ - $p < 0.04$) e γ -INF ($21.2 \pm 3.4/7.3 \pm 1.8\%$ - $p < 0.0002$) e menores níveis de

ABSTRACT

In previous papers, we have showed that in HIV seronegative individuals, the severity of Pulmonary Tuberculosis (PT) was modulated by Th1/Th2 profiles in pulmonar affected areas: predominance of Th1 ($30.9 \pm 14.3/24.3 \pm 9.7\%$ - $p < 0.04$) and INF- γ ($21.1 \pm 3.4/7.3 \pm 1.8\%$ - $p < 0.0002$) and decreased

¹ Assistente Hospitalar Graduada*

² Professor Associado/Agregado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

³ Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁴ Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁵ Técnico Superior da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁶ Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁷ Chefe de Serviço dos Hospitais da Universidade de Coimbra

⁸ Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

* À altura da realização deste trabalho, colocada nos Hospitais da Universidade de Coimbra

Recebido para publicação: 99.09.07

Accite para publicação: 99.10.08

IL-4 ($5.4 \pm 1.7/10.3 \pm 1.3\%$ – $p < 0.0004$) no LLBA das formas ligeiras, em relação às mais graves. No sangue, curiosamente, existia sempre um perfil Th1 superior ao Th2, independentemente da gravidade da situação. Neste contexto, procurou-se averiguar as características deste perfil no pulmão profundo de doentes co-infectados (SIDA/TP).

Para isso estudou-se um grupo de 16 indivíduos (13 homens e 3 mulheres, com uma média de idades de 39.4 ± 10.8 anos, todos infectados pelo VIH1, sendo 9 deles toxicodependentes) através dos seguintes parâmetros: (1) determinação da celularidade total e percentual do LLBA em câmara de Neubauer e leitura por microscopia óptica; (2) contagem das populações (B e T) e das subpopulações linfocitárias (CD4, CD8, $\gamma\delta$, CD16 CD56 e CD3+ $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$); (3) avaliação do fenótipo Th1/Th2, através da contagem das células CD4+CD7+(Th1) e CD4+CD7-(Th2). Estas determinações, efectuadas no LLBA e sangue, foram obtidas com anticorpos monoclonais e leitura em citometria de fluxo.

Dos resultados salienta-se: (1) presença de uma ligeira alveolite (225 ± 83.4 células/ml) com predomínio de macrófagos ($92.4 \pm 3.5\%$); (2) importante queda da subpopulação CD4, tanto no LLBA ($13.5 \pm 13\%$) como no sangue ($13.6 \pm 12\%$), acompanhada por uma expressiva elevação das células CD8 no LLBA ($61.8 \pm 18\%$); (3) diminuição da actividade NK marcada pelos CD16 CD56 ($2.2 \pm 1.6\%$ no LLBA e $5.1 \pm 6.1\%$ no sangue); (4) elevação do número de células duplamente negativas ($7.9 \pm 5.8\%$ no LLBA e $6.4 \pm 4.3\%$ no sangue); (5) notória diminuição dos fenótipos Th1 e Th2, tanto no LLBA ($7.7 \pm 7.6\%$ de Th1 e $5.9 \pm 6.4\%$ de Th2) como no sangue ($9.2 \pm 10.2\%$ de Th1 e $4.4 \pm 4.6\%$ de Th2).

Estes resultados sugerem, como conclusão, que se a gravidade das lesões tuberculosas nos pulmões de indivíduos VIH negativos era acompanhada por um progressivo aumento do perfil Th2 nas áreas atingidas, as lesões dos indivíduos co-infectados (SIDA/TP) são caracterizados por uma importante queda das células Th1, sem aparente elevação do número de células Th2, e que, nestas condições, a diminuição de uma resposta Th1 parece encontrar-se mais dependente da depleção em linfócitos T-CD4 e da consequente supressão citocínica a cargo do eixo monocítico/macrofágico.

REV PORT PNEUMOL 1999; V (5): 467-475

Palavras - chave: Tuberculose; co-infecção Tuberculose/SIDA; perfis Linfocitários Th1/Th2.

levels IL-4 ($5.4 \pm 1.7/10.3 \pm 1.3\%$ – $p < 0.0004$) in BALF of mild forms of PT, in relation to severe forms of this infection. However, in blood we found always a Th1 profile not dependent on the severity of pulmonary lesions. In this context, we tried to evaluate the patients co-infected with tuberculosis and AIDS. We studied 16 individuals (13 males and 3 females) aged 39.4 ± 10.8 years, all HIV 1 (9 drug users), through: BALF total and percentual cellularity by optic microscopy, T and B population and subsets (CD4, CD8, $\gamma\delta$, CD16 CD56 and CD3+ $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$) evaluation of Th1/Th2 profile CD4+CD7+(Th1) and CD4+CD7-(Th2), by monoclonal antibodies and flow cytometry. These evaluations were carried on BALF and blood. Results: mild macrophage ($92.4 \pm 3.5\%$) alveolitis (225 ± 83.4 cells/m³), decrease of CD4 subset in BALF ($13.5 \pm 13\%$) and blood ($13.6 \pm 12\%$) with increased counts of CD8 cells in BALF ($61.8 \pm 18\%$); decreased NK activity ($2.2 \pm 1.6\%$ in BALF and $5.1 \pm 6.1\%$ in blood); increasing double negative cells ($7.9 \pm 5.8\%$ in BALF and $6.4 \pm 4.3\%$ in blood); decrease of Th1 and Th2 cells in BALF ($7.7 \pm 7.6\%$ – Th1 and $4.4 \pm 4.6\%$ – Th2). These results suggest that while in HIV seronegative individuals the severity of PT lesions are closely related with the increase of Th2 cells in the affected areas, in patients co-infected with tuberculosis and AIDS we found an important decrease of Th1 cells without any increase of Th2 cells. So, in PT/AIDS the variations of the Th1/Th2 profile seems to be more dependent on the T-CD4 depletion than from cytokine suppression.

REV PORT PNEUMOL 1999; V (5): 467-475

Key-words: Tuberculosis; co - infection Tuberculosis/AIDS; Th1/Th2 lymphocytic profile.

INTRODUÇÃO

Em investigações anteriores, dirigidas ao estudo do pulmão profundo, quer ao longo da infecção VIH, quer no decurso da infecção tuberculosa, pudemos constatar o seguinte:

- Nos indivíduos infectados pelo VIH assistia-se a uma progressiva queda da subpopulação linfocitária T-CD4 (1,2) e do seu fenótipo Th1 (3), com valores significativamente diminuídos, já desde a fase assintomática da doença (1,2,3).
- Nos doentes portadores de tuberculose pulmonar (TP) isolada, foi possível reconhecer, nas áreas lesadas, variações dos perfis linfocitários Th1/Th2 de acordo com a gravidade da situação clínica: predomínio de Th1 e de γ interferon (γ -INF) nas formas menos graves e de Th2 e interleucina-4 (IL-4) nos quadros clínicos mais graves (4,5,6).
- Estas alterações, particularmente a elevação do

perfil Th2 nas situações mais graves, manifestavam-se preponderantemente nas regiões pulmonares atingidas, já que no sangue se observava sempre um predomínio de linfócitos Th1 e de γ -INF, independentemente da gravidade da situação clínica, sugerindo uma compartimentação pulmonar destes mecanismos patogénicos face à agressão pelo *Mycobacterium tuberculosis* (4,5,6).

- Possibilidade de marcação dos fenótipos linfocitários Th1/Th2 através da contagem das células CD4 CD7 (4,5) face à muito significativa correlação das células CD4+CD7+ com o γ -INF (perfil Th1) e das células CD4+ CD7- com a IL4 (perfil Th2) (Fig.1).

Neste contexto procurámos averiguar até que ponto a infecção VIH seria susceptível de modular a gravidade da TP, através de uma eventual influência exercida sobre os perfis linfocitários Th1/Th2, em indivíduos co-infectados (TP/SIDA).

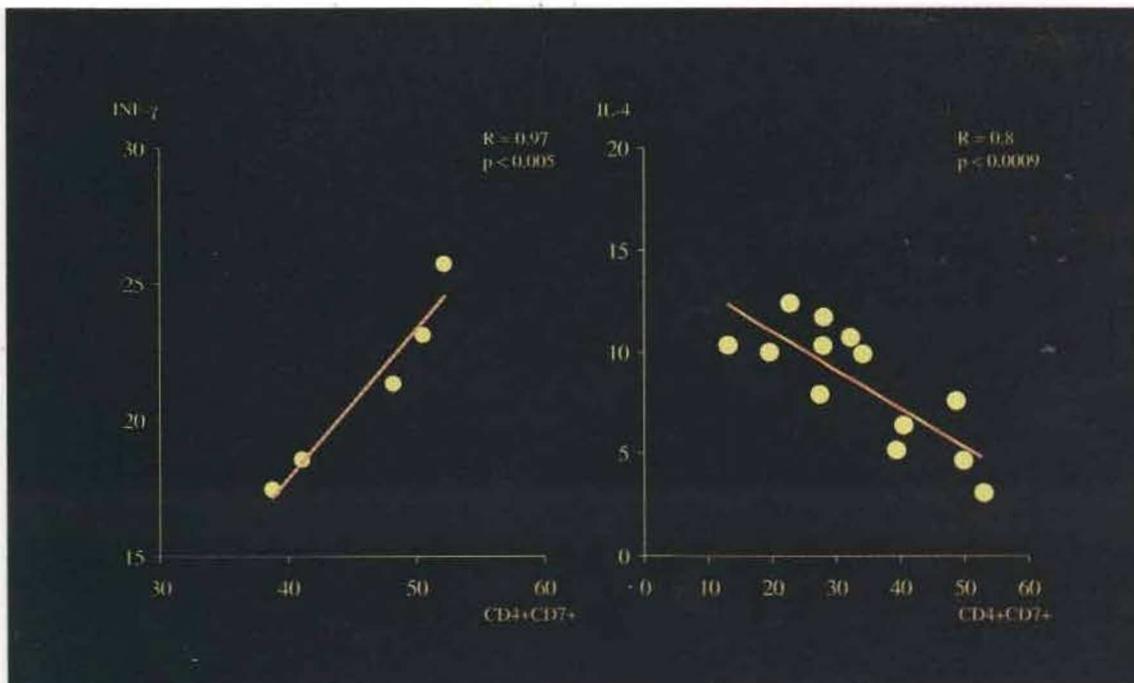


Fig. 1 – Correlação de CD4+CD7+ (Th1/Th2) com γ -INF e IL-4 no LLBA da Tuberculose Pulmonar

MATERIAL

Foram estudados 16 doentes portadores de TP/SIDA (13 homens e 3 mulheres), com uma média de idades de 39.4± 10.8 anos, todos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* e pelo VIH 1.

Nove destes doentes eram toxicodependentes. Deste conjunto, 4 não fumavam e 12 eram fumadores (carga tabágica de 22 maços/ano).

MÉTODOS

Neste conjunto de indivíduos foi aplicada a seguinte metodologia de estudo:

- No líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) recolhido nas áreas pulmonares atingidas efectuou-se a determinação da celularidade total e percentual através de contagem na câmara de Neubauer e de leitura por microscopia óptica.

- No LLBA e no sangue procedeu-se à contagem das populações linfocitárias B e T e das subpopulações CD4, CD8, $\gamma\delta$, CD16 CD56 (NK) e CD3+ $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ - (duplamente negativas), e à avaliação dos fenótipos Th1 (CD4+CD7+) e Th2 (CD4+CD7-), com anticorpos monoclonais e leitura por citometria de fluxo.
- O estudo estatístico foi efectuado através do teste T-student.

RESULTADOS

Dos resultados obtidos destacam-se:

- Presença de uma ligeira alveolite (225±83.4 células/ml), com normal distribuição percentual dos diferentes elementos celulares (92.4±3.5% de macrófagos, 5.5±9.6% de linfócitos, 1.5±0.7% de polimorfonucleares neutrófilos e 0.6±0.2% de eosinófilos) (Fig.2).
- Quanto às populações linfocitárias, assistiu-se

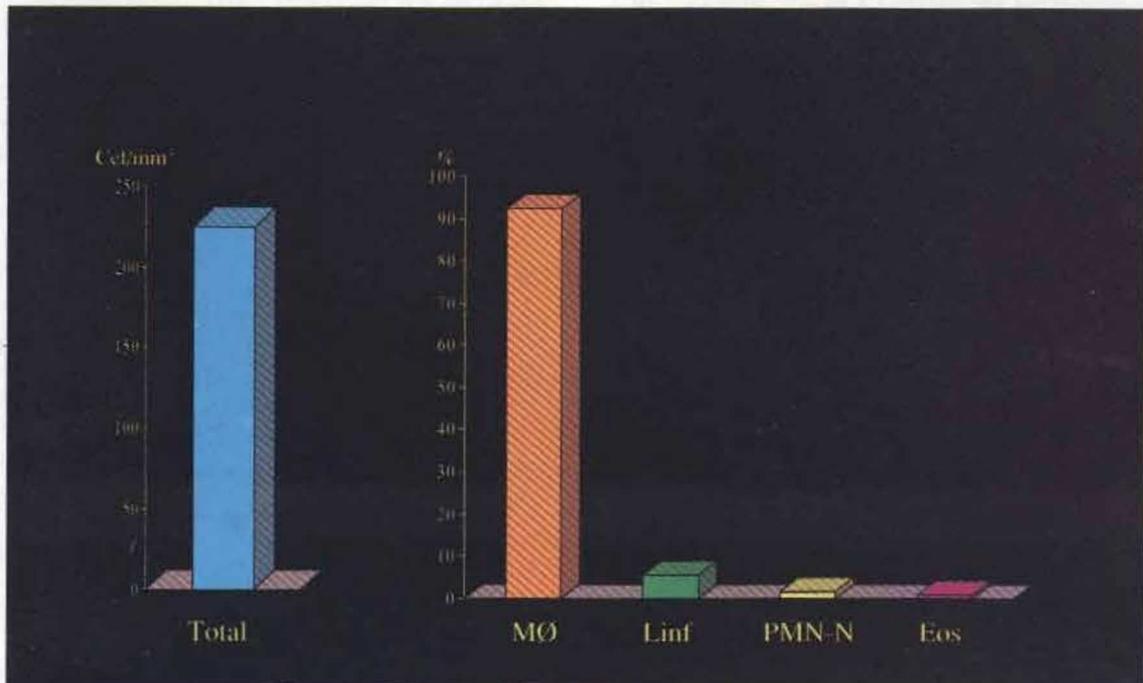


Fig. 2 – Celularidade total e percentual do LLBA

- (Fig.3) a uma pequena diminuição das taxas de células T, tanto no LLBA ($83.0 \pm 17.0\%$) como no sangue ($69.2 \pm 13.6\%$). Já as determinações dirigidas às células B apontavam para uma ligeira elevação dos seus valores (Fig.3) em qualquer dos meios biológicos considerados ($1.1 \pm 1.6\%$ no LLBA e $12.1 \pm 9.7\%$) no sangue.
- Pelo que diz respeito às subpopulações linfocitárias, a percentagem de células T-CD4 (Fig.4) encontrava-se profundamente diminuída, tanto no LLBA ($13.5 \pm 13\%$) como no sangue ($13.6 \pm 12\%$), sendo esta alteração acompanhada por uma importante elevação das células T-CD8 (Fig.4) ($61.8 \pm 18\%$ no LLBA e $50.1 \pm 12.5\%$ no sangue), o que originava uma acentuada queda da relação CD4/CD8 em ambos os meios (0.3 ± 0.3 tanto no LLBA como no sangue).
 - As células T- $\gamma\delta$ cursavam com os seguintes valores (Fig.5): $4.8 \pm 3.9\%$ no LLBA e $4.0 \pm 3.0\%$ no sangue; no entanto, a actividade NK marcada pelos CD16 CD56 (Fig.6) encontrava-se

diminuída ($2.2 \pm 1.6\%$ no LLBA e $5.1 \pm 6.1\%$ no sangue). Paralelamente, o número de células duplamente negativas ($CD3+\alpha\beta-\gamma\delta-$) era alvo de um aumento, tanto no LLBA ($7.9 \pm 5.8\%$) como no sangue ($6.4 \pm 4.3\%$).

- Já quanto aos fenótipos Th1/Th2 (Fig.7) viria a assistir-se a uma notória queda destes elementos celulares, quer no LLBA ($7.7 \pm 7.6\%$ de Th1 e $5.9 \pm 6.4\%$ de Th2), quer no sangue ($9.2 \pm 10.2\%$ de Th1 e $4.4 \pm 4.6\%$ de Th2).

DISCUSSÃO

Face às variações dos diversos parâmetros imunológicos detectados no pulmão profundo, estes doentes parecem encontrar-se num estadio evolutivo da sua retrovírose situado entre a fase assintomática e a fase de SIDA, quando comparados com os valores obtidos no estudo dirigido aos indivíduos apenas atingidos pela infecção VIH (1,2). Entretanto, quando se com-

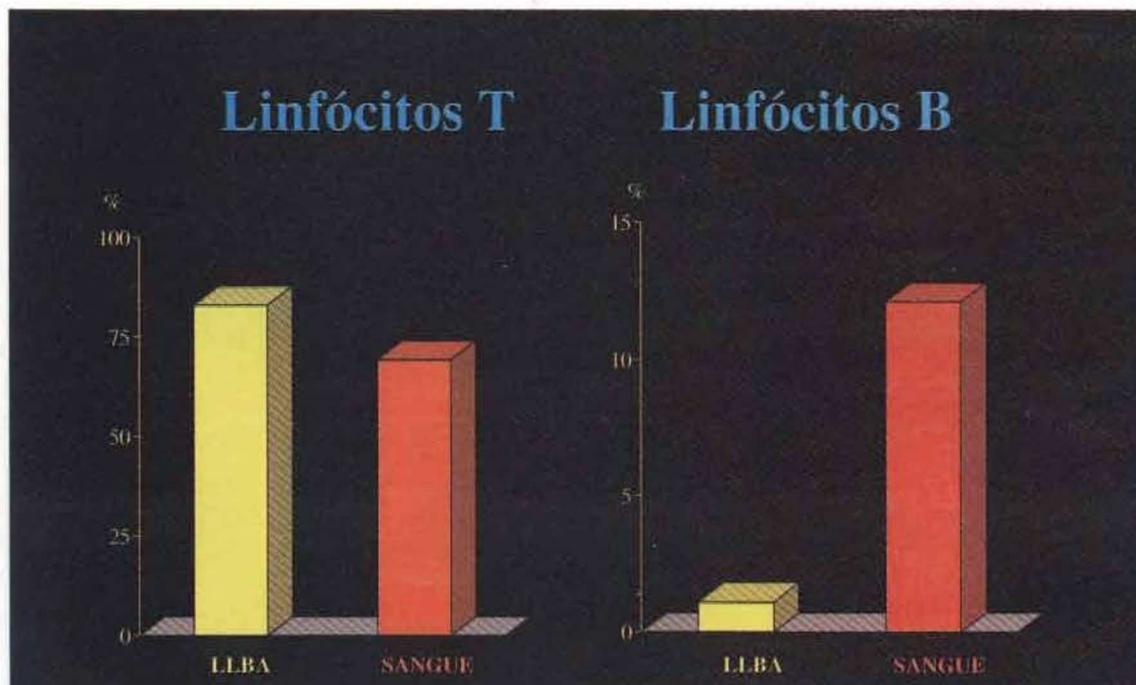


Fig. 3 – Percentagem de linfócitos T e B no LLBA e no SANGUE

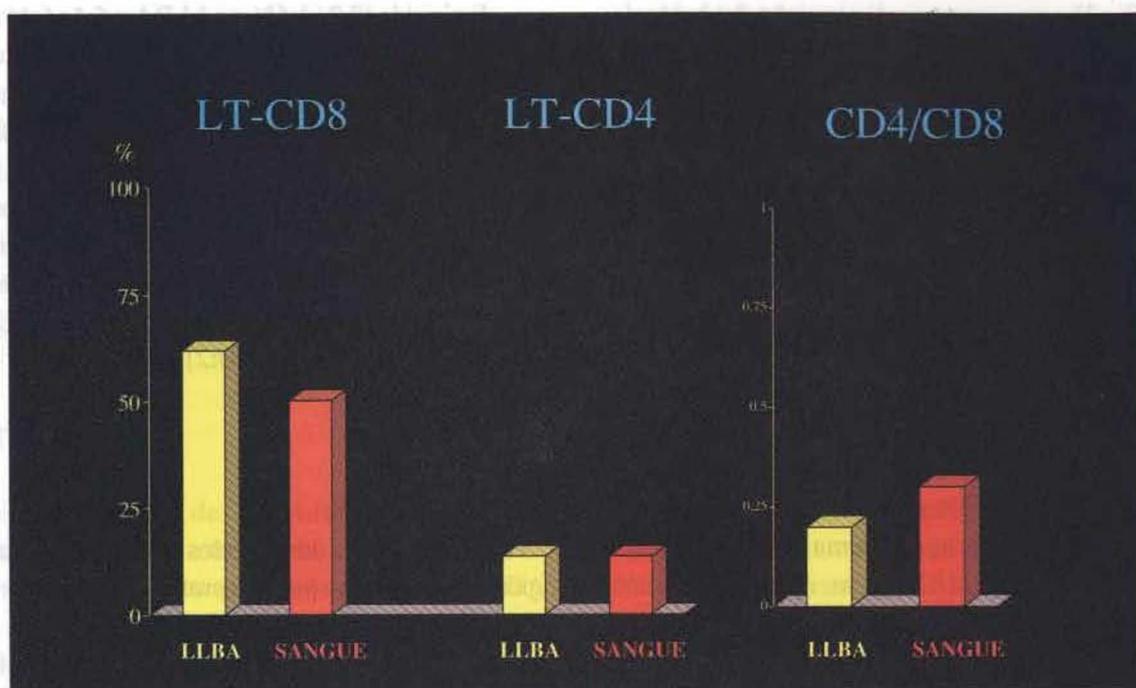


Fig. 4 – Percentagem de células CD8, CD4 e relação CD4/CD8 no LLBA e no SANGUE

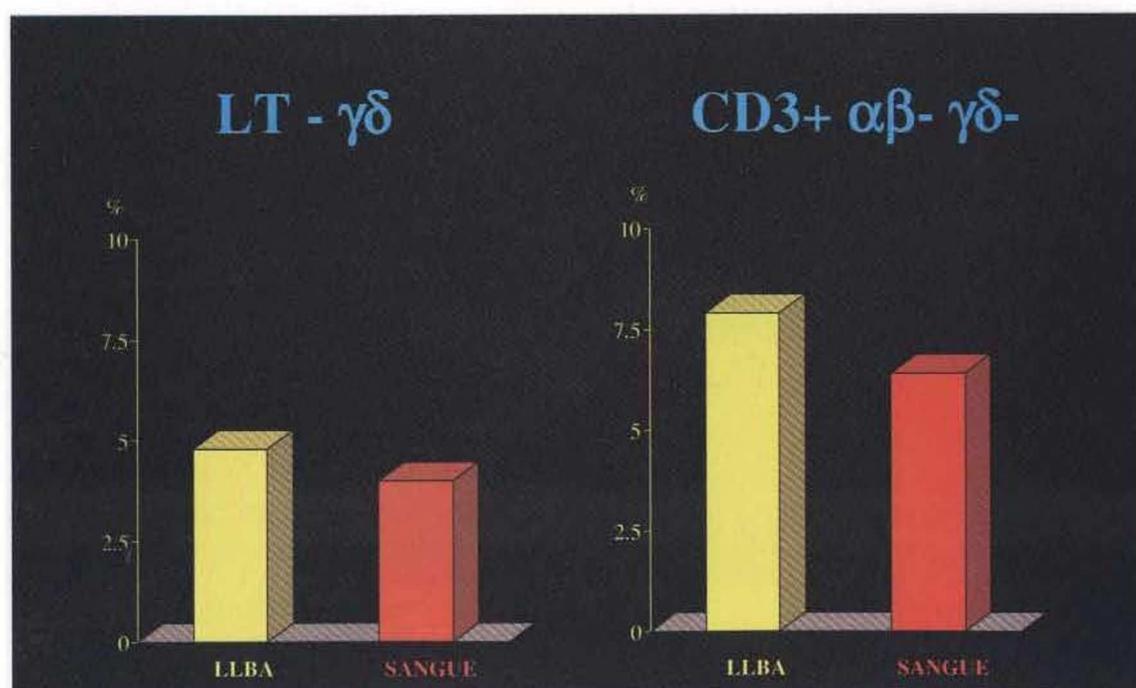


Fig. 5 – Percentagem de $\gamma\delta$ e células duplamente negativas no LLBA e no SANGUE

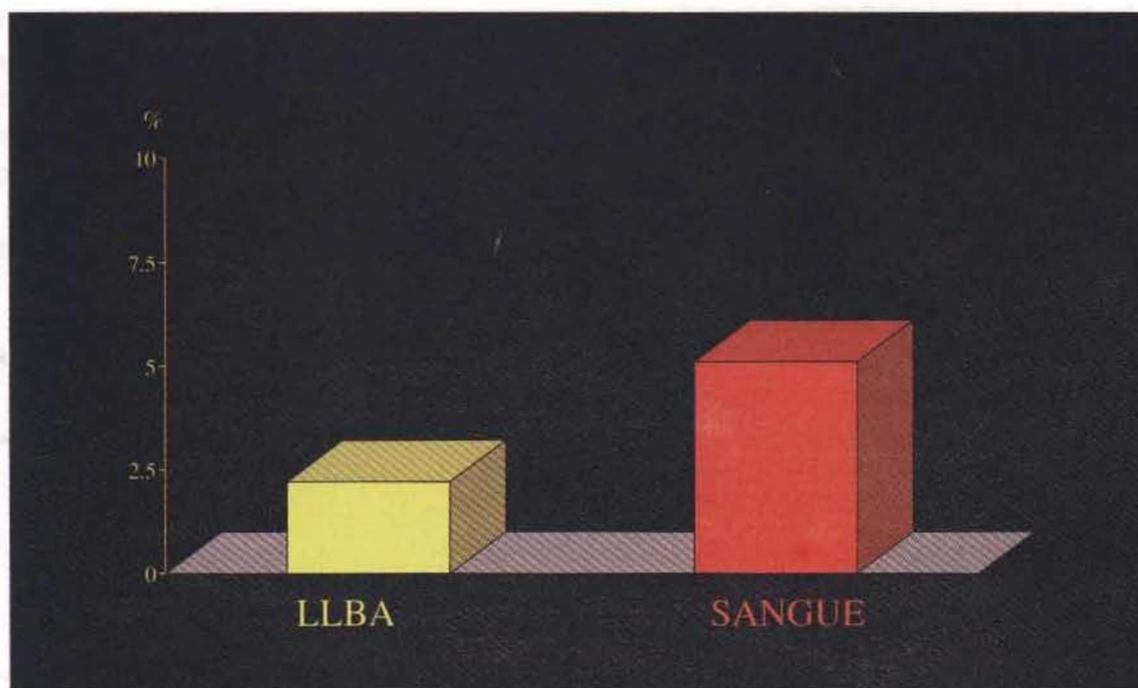


Fig. 6 – Percentagem de células CD16CD56 (NK) no LLBA e no SANGUE

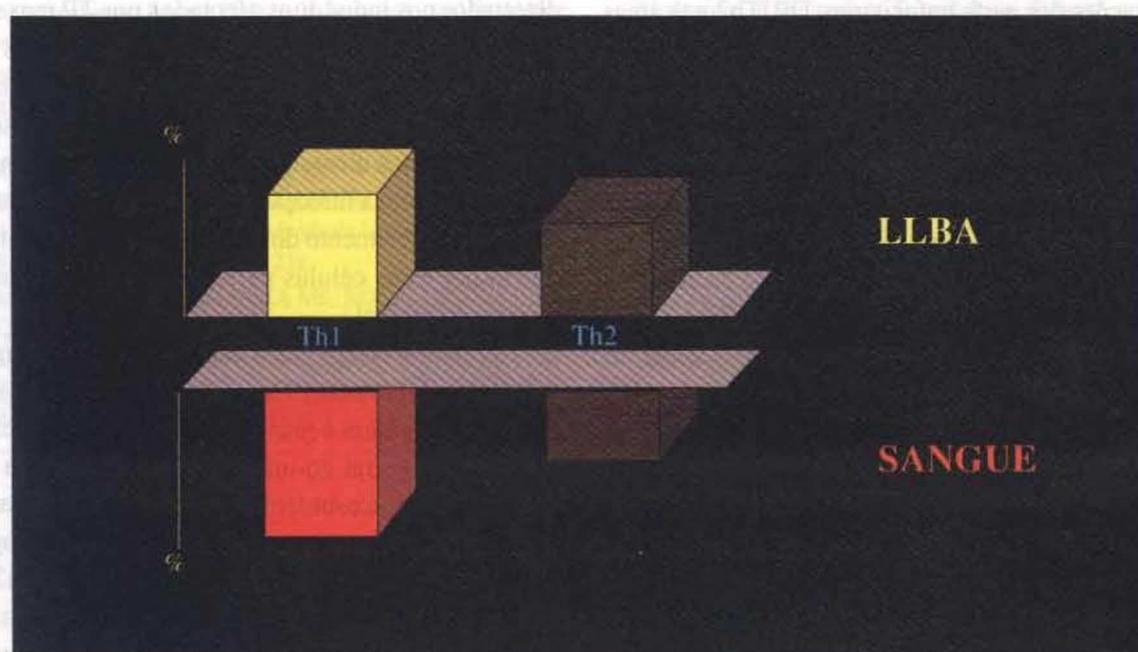


Fig. 7 – Percentagem de CD4+CD7+(Th1) e CD4+CD7- (Th2) no LLBA e no SANGUE

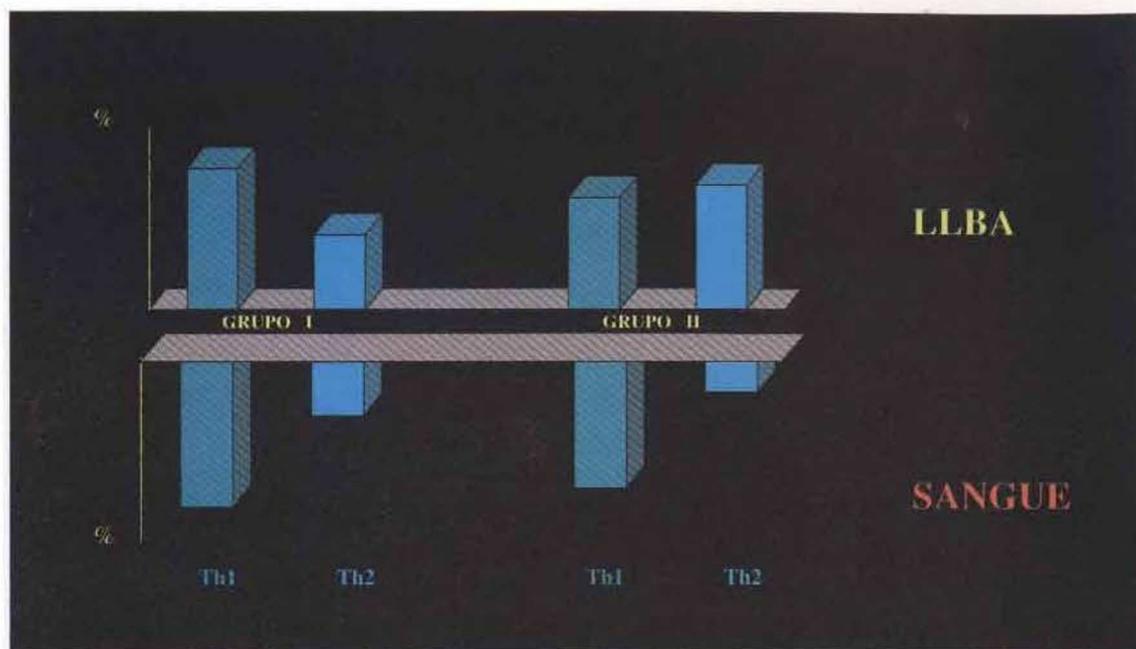


Fig. 8 – Percentagem de linfócitos Th1 e Th2 (LLBA e SANGUE) nas formas menos graves (Grupo I) e severas (Grupo II) da Tuberculose Pulmonar

param estes resultados com os correspondentes aos portadores de TP isolada (4,5,6) pode-se constatar que as variações dos perfis linfocitários Th1/Th2 nas áreas pulmonares lesadas são substancialmente distintas, particularmente quando se procura correlacionar essas variações com a gravidade da infecção tuberculosa. Com efeito, nesta, e a par da queda do fenótipo Th1, a variação mais relevante corresponde a uma significativa elevação do fenótipo Th2, apenas no órgão lesado (Fig.8), paralela à gravidade da afecção.

Ora, nas situações de co-infecção TP/SIDA pôde-se assistir, tanto nas regiões atingidas, como no sangue, a uma importante queda dos perfis Th1 e Th2 acompanhando uma diminuição da subpopulação T-CD4. Nestas circunstâncias, a diminuição do perfil Th1, parece estar mais dependente da depleção das células T-CD4 resultante do efeito citopático da retrovirose do que do efeito citocínico supressor associado a uma elevação do perfil Th2, típico das formas clinicamente graves da TP isolada (6).

Por outro lado, os doentes que integraram este

estudo apresentavam uma percentagem de células T-CD8 que atingia praticamente o dobro dos valores detectados nos indivíduos afectados por TP mas sem infecção VIH, sendo, no entanto, semelhantes aos que foram observados naqueles que apenas se encontravam afectados pela retrovirose (1,2,3). Por isso, a elevação destes elementos celulares deverá relacionar-se mais com a infecção VIH, o que está de acordo com o reconhecimento do importante papel desempenhado por estas células na tentativa de controlo da replicação viral.

Também o progressivo aumento da percentagem de células duplamente negativas (CD3+ $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -), de uma forma paralela à gravidade da infecção tuberculosa (6), atinge na co-infecção TP/SIDA a sua expressão mais exuberante, podendo encontrar-se dependente de fenómenos de "morte celular programada" que eventualmente atinjam as células Th2.

Assim, as alterações imunitárias presentes no pulmão profundo dos doentes co-infectados e particularmente aquelas que são induzidas pela infecção

VIH, parecem assumir importantes repercussões patogénicas, acabando, naturalmente, por modular os aspectos anatomopatológicos e clinico-radiológicos da infecção tuberculosa e, neste contexto, poderem ser parcialmente responsabilizadas pelas características muito particulares que a TP assume no âmbito desta co-infecção.

CONCLUSÕES

- Se a gravidade das lesões tuberculosas nos pulmões de indivíduos VIH negativos era expressa por uma importante elevação do perfil Th2 nas áreas atingidas, as lesões dos indivíduos co-

-infectados (TP/SIDA) são caracterizadas por uma importante queda do perfil Th1, sem correspondente elevação do número de células Th2.

- Nestas condições, a diminuição de uma resposta Th1 parece mais dependente da depleção das células T-CD4, e consequente supressão citocínica a cargo do eixo monocítico/macrofágico, do que do efeito citocínico supressor de um perfil Th2 exacerbado.
- Assim, a infecção VIH parece modular patogenicamente a evolução da infecção tuberculosa concomitante, sendo responsável pelas características anatomopatológicas e clinico-radiológicas que a TP assume no contexto desta co-infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAGANHA MF, LEITE I, MARQUES MAT, MOTA PINTO A, LIMA MAM, ANJOS A, CORTE REAL R, ROSA MAS, MELIÇO SILVESTRE A, ROBALO CORDEIRO AJA. Bronchoalveolar Lavage Fluid in the Immunological Evaluation of HIV Positive Individuals. Abstract Book of the 4th International Conference in Bronchoalveolar Lavage 1999; 3: 47.
2. BAGANHA MF, MARQUES MAT, LEITE I, ROBALO CORDEIRO C, MOTA PINTO A, TEIXEIRA ML, CORTE REAL R, LEITE C, SANTOS ROSA MA, MELIÇO SILVESTRE A, ROBALO CORDEIRO AJA. Subclinical Alveolitis in Assymptomatic Individuals Infected by HIV. Eur. Resp. J 1994; 7 (Suppl. 18): 121s.
3. MARQUES MAT, BAGANHA MF, ROBALO CORDEIRO C, MOTA PINTO A, MESQUITA L, CORTE REAL R, LEITE ACP, SANTOS ROSA MA, MELIÇO SILVESTRE A. Th1/Th2 Ratio (BALF and Blood) in HIV Infection. Eur. Resp. J 1996; 9 (Suppl. 23): 137s.
4. MARQUES MAT, MOTA PINTO A, VERA L, MESQUITA L, ALCOBIA C, SANTOS ROSA MA, BAGANHA MF. Lymphocytic Th1/Th2 Profile (Blood and BALF) in the Evaluation of Pulmonary Tuberculosis. Tubercul. and Lung Disease 1996; 77 (Suppl. 2): 113.
5. MARQUES MAT, ROBALO CORDEIRO C, MOTA PINTO A, VERA A, MESQUITA L, ALCOBIA C, SANTOS ROSA MA, BAGANHA MF. Pulmonary Tuberculosis Severity and Th1/Th2 Lymphocytic Profiles (Blood and BALF). Eur. Resp. J 1997; 10 (Suppl. 25): 451s.
6. BAGANHA MF, TAVARES MARQUES MA, MOTA PINTO A, VERA L, MESQUITA L, ROBALO CORDEIRO C, ALCOBIA C, BOTELHO MF, SANTOS ROSA MA. Influência dos Perfis Th1 e Th2 no Espectro de Gravidade da Tuberculose Pulmonar. Rev. Port. Pneumol 1998; 6: 535-580.