REV PORT PNEUMOL IV (4): 393-402

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

Respostas Thl e Th2 desencadeadas por Mycobacterium tuberculosis virulento em doentes com tuberculose pulmonar

Thl and Th2 responses elicited by virulent Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis patients

DIANE J. ORDWAY t..l, MARIA J. ARROZ 2

• ANDERSON FERNANDI.:.S

HAZEL M. DOCKR.ELL 3 c FERNANDO A. VENTURA u

4

RESUMO

Analisaram-se as respostas Thl e Th2 desencadea-das por Mycobacterium tuberculosis virulento em doentes com tuberculose pulmonar (TP) e em dado-res saudaveis vacinados pela BCG. Efectuaram-se entre a capacidade que as celulas T apresentavam para proliferar e para produzir IFN-y e IL-5 em resposta aos derivados de proteins purifi-cada (PPD), M. tuberculosis H37Rv (Mtb), e M. tuberculosis H37Rv inactivado pelo calor (hk Mtb).

ABSTRACT

The contribution of Th I and Th2 responses elicited by virulent Mycobacterium tuberculosis was investigated, in healthy BCG vaccinated individuals and pulmonary tuberculosis patients. Comparisons were made between the T cell capacity to proliferate, produce JFN-y and JL-5 in response to the soluable antigen purified protein derivative (PPD), live M. tuberculosis H37Rv (Mtb) and heat killedM tubercu-losis H37Rv (hk Mtb). These studies demonstrated

1 Centro de Malaria e Outras Docm;:as Tropicais/IHMT/UNL. Rua da Junqucira. 96. 1300 l.isboa. Portugal.
> Hospital Egas Moniz. Rua da Junquctr-.J 126,1300 Lisboa. Portugal.
, London School of Hygiene & Tropical Medicine. Keppel Street, London WCIE 711T. UK.
' Faculdade de Ciencias MMicas, UNL, Lisboa, Portugal.

Recebido para 98.07.23
Aceite para 98.9.07

Julho/Agosto 1998 393

REVIS I A l'<lll'l .. DE

Este estudo dtmoostrou que os indi,iduos bAUd A· vels vaclnndos com IJCG tvldeodarniJl URI maximo
dt M I I•N-y em rtspostn ao
pRin•l de e que \1tb vh·o destncndeou umH reN(U)•dM !'lignific:..th·amentf" mailil (lllf' n nhtid» r•cln Mlh J1t!IH calor. F.mhoraa n.ll dm:r .. cl'l com tubcn:ulo8c pulmonar
respost•• mtdi•• mllis baillls de c de de fFN-y em ""' euutrulus ••uda-
veis, a rcsposta proliferativa ao PPO nio foi >iguir .. cath•an•cotc rcduzida, cuquaoto que a respo•ta ao Mtb c hk Mtb fora., cstatisllcamrotr. Em concl•slo na nobertolose plllmoaar a
dt ti'N·y podt cstar rtduzida .wm am eo• tomltante numento de conlirmando-se asslm nlo txlstir

uma mudAnfa de mpcma 'I hi para 'I hl na tubercu· lose pulmon a r.

llfo:V 1'0111 I'NF.IJMOL 19911; IV (4): :19:1·402

Paabn-rMs .. ch»\'c: lrnuuidadc Cdulnr. CiLm:iuus, l'uh1,;r· Pulillonac, 1 cspostas Thl c Tli1.

INTROOU('.l.O

A Tuhcn:ulosc c um grave problema tk S<tude pubhC1lno mundo imcim. o qual sc tcm vindo H tUil\!lr cada vezmms proenunente como impacto da
pelo VIH e a multirrestsrencia aos filrmacos amihacila· res. Em Portugal, a incidencia de tuberculose mamcm-rnuilo clevatla com mais de SJ novos casos por 100 mil hltbil;mlcs (I), 3 vezes superior;\ media da mniotin dos OUlrOS raises da Comunidade l!uropcia (2.3.4).
F.mh.wa 11 vacina de bow.;
R('(i scju u'ada no mundu intciro, a sua dicllci<t lcm V8ri0d0 C<11U0 toi dCJll011StracJo CITl
pubhcados sendo as regtiies en<lc!nucaq de
tubcrculose (S). A imunidade protectoro conlt8 a tubcrculose e geralrnente assumida como sendo dcpc;ndcntc de cclulas T e mediada por citocinas, comu por cxcmplo lFN-y e TNF-a, o que resulb na t1Cii va1•i<o tlos macr6f;igos infectados ou na citolise das CC:Iulas pur cclulas T CD4 I, T CD8t c Tyll. F.mhrtra ICnha sicln dificil provM por expn imen-111 virm com macl'i>iag,ns hu1nanos que o IFN-y

394

tloat eoulrul indi>idllals shm••rl tht stronCHI mean proliferatin and IFN-y ...,.punsffl
OlltiRCic autigcu panel and M th elicited • sit:nifi· contly rcspuu•c Ibn Ilk Mtb. Allhc1111:h, pulmonary tuberculosis paticub shuwcd tu .. er cnean proliferation and I FN-y toward) all the antigen• when rompartd to tht ronro-ol g•·oup, proliferative ffllpnnses to l'l'O were found not to be slplftco11tly reduced, while lhe red11ction In the response to Mtb . . d hk Mtb preparali11ns ...... .tali!tlully sl&nlft-ca•L lo in r••lmonary fubt:rt n&Mis inferno• mUll produttioo nf IF'I-y m•> lw red•tcd
but no eoatolllitaut incrc.>< in produc:lioft
Ot<>urred. 1'h<$e data confirm tbat thrr<: is ao ... itch from a Till response to • Thl rcspo11st in rubcrcuk>- sis infection.

REV PORT 1?98; IV (4): 393-402

Key-woo·ds: Cellular lmmut>ny, Cytokmes, Pulmonary tuberculoses. ThJ and Thl

iudu' a monc bactcnana. mostrou-sc que mediavn clc I 9 o bactcriano (6)
e esta de.;crito que o IFN-y das celulas T pode irubir o cresctmento mtracclular de Mtb (7).
As respostas das cttocma$ na tubcrculoS<t
aprescntam alguma c 1llui1os lltck>rcs innucnciam o resultado final da in vitro. A dicolomia da produc:io de citocinos de tipo I c ric tipo 2 lcrn sido em v:trias infcccilcs, com um tipo de rcsposta con rcrindu e o outro estando associado a docuc;w cclulus Thl produ-z.em IL-2, IFN-y c linfictuxiiHl bcm como oulras citocinas, cnquanto as cc!lulas l'h2 prudut.cm II ,-4, IL-5, IL.·6, e outras citocinas mas nno IL-2 ou IP.'-1-y
(9) \losdot:mes com tuberculosc. a cxpressllo de IL,-2 e de lf'l\-y (fhl) JtlO!jtrou cslar dcprimida quer quando os PBMC cram com Mtb Erdman inacti-vodo pelo calor (Ill) qucr com Mtb JH7Rv viva {II) ou I' PO (12). l:.sta da Thl niio cstava assoctada com aumento de prvdw,:iio de IL-4
ou de ll,-1 0 CTh2), a qual era nos clocnlcs
com tubcrculose e nos dadores de COillrolo. No en tan-

lulho/Agosto 1998

RES POST AS TH I E TH2 DESENCADEADAS POR MYCOBACTERiUM TUBERCULOSIS VLRULENTO EM DOENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR

to, Surcel e colaboradores (1 J) mostraram que o
numero de celulas secretoras de IFN-y nao estava
diminuido nos doentcs com tubercuJose activa, e que
a de IL-4 e mais fi"equente que nos controlos
saudaveis.
A interpretac;ao dos estudos in vitro da imunidade humana a infecc;ao pelo M. tuberculosis e em muitos aspectos urn desafio. A infecc;ao com Mtb virulento e dificil, devido ao facto de estes mieroorganismos terem tendencia a formar agregados e, em ratios altos de infeecyao, serem t6xicos para as celulas. Estudos utilizando estirpes avirulentas sao informativos, mas as conclus6es nao sao claras quando se com para com as capacidades de uma cstirpe que causa doenc;a. Embora os modelos animais fornec;am muitos dados sobre a tuberculose, as discrepancias entre as respostas humana e murina ao Mtb apontam para a necessidade da cxperimentac;ao in vitro humana na qual as respos-tas imunitarias mediadas por celulas possam ser avaliadas em relac;ao as cstirpcs virulentas do M.
tuberculosis.

Neste estudo foi nosso objcctivo avaliar as respos-tas Thl e Th2 aos derivados de PPD, M. tuberculosis virulento e uma preparac;ao de M. tuberculosis inacti-vado pelo calor, em docntes com tubcrculose pulmo-nar (TP). 0 presente estudo dcmonstra que a media de produc;ao de lFN-y nos doentcs com tuberculose pulmonar apresenta uma ligeira diminuic;ao, e que o numero de individuos que produzem [L-5 apos esti-com M. tuberculosis e semelhante ao do
grupo controlo.

MATERIAL E METODOS

lndividuos

Este estudo inclui 35 individuos portugueses (14 mulheres e 21 homens), compreendendo 20 dadores controlo e 15 doentes com tuberculose pulmonar com doencya cavitada, seronegativos para VIHl e 2. Os individuos inclufdos no estudo tinham idades compre-endidas entre os 20 e os 60 anos (idade media ± DP,

Julho/Agostol998

35.1 ± 11.2 anos), e a maioria (70%) tinha sido vaci-nada com bacilo de Calmette-Guerin (BCG). Tanto os controlos saudaveis como os doentes tinham uma proveniencia etnica semelhante. Foi colhido sangue dos doentes com tuberculose antes ou na mesma semana em que foi iniciada a terapeutica antibacilar. Foi obtido consentimento por escrito eo protocolo foi aprovado pela comissao de ctica local. 0 grupo controlo era composto por individuos saudaveis vacinados com BCG, que apresentavam urn teste cutaneo de Mantoux positivo, mas que nao tinham historia previa de TP. Os testes de Mantoux foram cfcctuados alguns meses antes da colheita do sangue ou imediatamente a scguir. A tuberculose pulmonar foi diagnosticada por radiogratia do torax e confirma-da por exame directo e/ou cultura de expectoracyao, sccrec;oes bronquicas ou lavado bronco-alveolar. A ausencia da infecc;ao pclo VJH-1 foi confirmada por ELISA c Western Blot.

Antigenios

PPD lote RT44 foi adquirida ao Statens Serumins-titutc, (Copenhaga, Dinamarca) e usados numa con-centrayao final de 1011g/ml. M. 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 colonia (cfu) por ratio de por macrofago. A mesma concentra-c;ao de M. tuberculosis H37Rv inactivado pelo caJor (hk Mtb) foi utilizada ap6s autoclavagem. Os antigeni-os foram todos testados para determinar a concentra-optima para uso. 0 mitogcnio fitohemaglutioina (PHA), (Difeo, Detroit Michigan, USA) foi usado como controlo positivo na concentrac;ao finaJ de 811glml.

Bacterias

M. tuberculosis H37Rv cresceu em caldo 71-19 enriquecido com glicerol c ADC (Bacto, Difco). As

395

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGLA

culturas desenvolveram-se a 37°C em agitador orbital de fase midlogaritmica, sendo depois alicutadas e congeladas a -7011C. M. tuberculosis H37Rv (hkMtb) inactivado pelo calor foi preparado por autoclavagem durante I 0 minutos e usados a I unidade formadora de

col6nias (cfu) por ratio de por macr6fago. Cada estirpe sofrcu passagens em media menos de tres vezes desde a recolha inicial.

Eosaio de

Celulas mononucleadas do sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cel/s-PBMC) foram isoladas de sangue heparinizado por gradiente de densidade. Os ensaios foram efectuados como descrito por Silveira et al (14). Resumidamente as celulas foram estimuladas com PPD. M. tuberculosis H37 Rv a urn ratio de I por macr6fago, M. tuberculosis H37 Rv inactivado pelo calor a urn ratio de I cfu por macr6fago e com PHA como controlo positivo. A radioactividade incorporada (Timidina Tritiada), foi medida em contador de LS 6500 (Beckman) e expressa em contagens por minuto (cpm). Os resul-tados das linfocitarias sao exprcssos como a media em cpm dos testes em triplicado menos a media em cpm das celulas nao estimuladas cultiva-das sem antigenio.

Eosaios de Citocioas

A quantidadc de lFN-y ou IL-5 presentes na cultura foi analisado por ELISA comercial (Endogen, WobUJll, MA, U.S.A.). Os sobrenadantes foram reco-lhidos para placas paralelas no dia 6, armazenados a - 20°C e analisados mais tarde de acordo com as instru-do fabricante.

Analise Estatistica

Usou-se o tcste-t de student para avaliar o signifi-

396

cado estatistico entre grupos de dados e onde existiam resultados emparelhados usou-se o teste-t de sudent emparelhado. Os dados seguiram uma
normal. Val ores de p<0.05 foram considerados estatfs-ticamente significativos.

RESULTADOS

Respostas Proliferativas
aos Antigenios Micobacterianos

Oadores Cootrolo

As PBMC dos 20 individuos vacinados com BCG mostraram a maior resposta proliferativa em ao PPD (Fig. Ia), seguidos pelo M. tuberculosis virulento (Fig. I a). A resposta induzida por M. tuberculosis vivo (p=O.OOO) foi significativamente maior que ada prepa-inaetivada pclo calor. A resposta proliferativa aos Mtb inactivados pclo calor foi menos evidente (Fig. Ia), embora estivesse aumentada quando comparada com os PBMC nao estimulados (p<0.05). Em geral, os individuos saudaveis desencadeavam uma resposta media mais forte em aos antigenios micobactc-rianos quando comparados com o outro grupo.

Ooentes com Tuberculose Pulmonar

As PBMC cstimuladas de docntes com tuberculosc pulmonar, seronegativos para o VIH (n= 15), mostra-ram uma resposta proliferativa media reduzida em a todos os antigenios quando comparados com
os controlos saudavcis. Os doentcs com tuberculose pulmonar mostraram respostas ao PPD (p=0 .. 302) (Fig. lb), que quando comparadas com as respostas dos controlos, nao eram estatisticamente reduzidas. No entanto as respostas induzidas pelos doentes com tuberculose pulmonar eram signi ficativamente reduzi-das para o M. tuberculosis (p=0,009) (Fig. lb) eo M. tuberculosis inactivado pelo calor (p=O,O 16), quando comparadas com os controlos. Tal como nos contro-

Julho/ Agosto 1998

RESPOSTAS TH I E TH2 DESENCADEADAS POR MYCOBACTERiUM TUBERCULOSIS VIRULENTO EM DOENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR

(b)

&l

§'

-

Q>

'S

r:: 40 0 ·e

0

._

8.
.!1 0

0

r::

8 i 20 8 0

e

0

a .Q 01
<(a ,g
0

s:: z

Fig. 1- Rcspostas proliferativas das cclulas mononucleadas do sangue peri fcrico (PBMC) induzidas por antigenios. Os resultados siio de 20 dadores saudaveis (a) e 15 doentes com tuberculose pulmonar (b). As celulas foram estimuladas durante 6 dias com dcrivados de proteina purificada (Protein Purified Derivative- PPD). M. wberculosis virulento (Mtb), uma de M. tuberculosis inactivado pclo calor (hk Mtb) e sem antigenio (No A g). A radioactividade incorporada (Timid ina Tritiada), foi medida em contador de LS 6500 (Beckman) e expressa em contagens por minuto (cpm).

los, o Mtb hk foi menos eficaz para despoletar uma
rcsposta proliferativa.

A Secre<;iio de IFN-yem resposta
aos Antigenios Micobacterianos

Simultaneamente com a proliferay,ao linfocitaria
mediram-se os niveis de IFN-y nos sobrenadantes das culturas estimuladas com os antigenios mico-bacterianos.

Dadores Controlo

A valiaram-se 20 dadores controlo em relayao a produrrao de IFN-y. Verificararn-se respostas mais altas quando os PBMC eram estimulados com PPD, Mtb, seguidas pela preparay,ao de Mtb inactivados

Julho/ Agosto 1998

pelo calor (Fig. 2a). 0 grupo controlo mostrou uma resposta media mais forte em relay,ao ao paine! de antigenios quando comparado com os doentes com tuberculose. Os dadores saudaveis desencadearam respostas significativamentc aumentadas (p=O.OOO) com o Mtb vivo quando comparadas com o Mtb morto pelo calor, dentro do grupo. 0 Mtb inactivado pelo calor induziu uma produyiio de TFN-y significativa-mente mais baixa quando comparada com o PPD c o Mtb. Houve uma maior variabilidade entre a capacida-de do dador para produzir IFN-y que a observada nas respostas proliferativas.

Doentes com Tuberculose Pulmonar

A media da secrey,iio de TFN-y pelas PBMC dos 15 doentes com tuberculose pulmonar estava diminuida para todos os antigenios micobacterianos (Fig. 2b),

Vol. IV NR4 397

R.EVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA

1CXXXl
(a) 0 0
0
0
0
0
0
600) 0 0

t7
6
0

0

4CXXl g 8
0

0 Q .a

0

0 8
8 8

0 6
0 :B :B

a.

a. -" J::.

Ol
<t
0
z

(b) 0

8CXX) 0

0

0
0
0
,g.
0

0

@
0

0
0
0

8

0

0
0
0
0

0

8
0 f---::ro __

. c Ol :E <t
:X 0
. c z

Fig. 2- Sccrccc;iio de IFN-y pelas celulas mononuclcadas do sanguc pcrifcrico (PBMC) induzidas por antigenios. Os resultados sao de 20 dadores saudaveis (a) e 15 docntcs com tuberculose pulmonar (b). Os sobrenadantes das culturas de PBMC que foram estimulados durante 6 dias com derivados de proteina purificada (Protein Purified Derivative- PPD). M. tuberculosis virulento
(Mtb). uma preparacao de M tuberculosis inactivado pclo calor (hk Mtb) e sem antigenio (No Ag). foram recolhidos e a quantidadc de IFN-y foi analisada por ELISA e expressa em pg/ml. A producao media de IFN-y para cada grupo c representada
por barras horizontais.

mas estas redu96es nao foram estatisticamcntc diferen-
tes (p >0.500) quando comparadas com os dadores
controlo. Tal como nos individuos saudaveis, PPD e
Mtb vivos induziram a mais alta produ9ii0 de LFN-y
nos doentes com tuberculose. Os Mtb inactivados pelo calor desencadearam uma produyao de IFN-y reduzida quando comparados com PPD e Mtb dentro do mesmo grupo.

A Secrer;iio de 11-5 em resposta
aos Antigenios Micobacterianos

Simultaneamente com a proliferac;:ao linfocitaria

Dadores controlo

A valiaram-se 20 dadorcs controlo em rclac;:ao a produc;:ao de IL-5. As concentrac;:oes mais elevadas de IL-5 verificaram-se quando as PBMC foram estimula-das com PPD, Mtb, seguidos pela preparac;:ao dos Mtb inactivados pelo calor (Fig. 3a), embora as diferenc;:as nao tcnham. sido significativas. Nao se verificaram diferenc;:as significativas entre as preparac;:oes de Mtb
vivos e inactivados na sua capacidade de induzir a
prodw;ao de IL-5 nos dadores saudaveis enos doentes
com tuberculose.

medira.m-se os niveis de IL-5 nos sobrenadantes das Doeotes com Tuberculose Pulmonar
cultura.s das PBMC estimuladas com os antigenios
micobacterianos. A secrec;:ao de fL-5 pelas PBMC dos 15 doentes

398 Vol. IV Nl1 4 Julho/Agostol998

RES POST AS TH I E TH2 DESENCADEADAS POR MYCOBACTERiUM TUBERCULOSIS V IRULENTO EM DOENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR

800

200

(I)

0

0
0

0

Q 0

0

J.
I ....

. Q 01
<

0 -"" z .r::

e

10CO ,---------------------.....,
(b)
0

800

&X)

0 0
400

8

0 0 200 0

i ' ..0.. 0
. Q Jf 0 .Q

a..

a.. .:.: 0
.r:: z

Fig. 3- de 1L-5 pelas celulas mononucleadas do sangue periferico (PBMC) induzidas por antigenios. Os resultados sao de 20 dadores saudaveis (a) e 15 doentes com tuberculose pulmonar (b). Os sobrenadantes das culturas de PBMC que foram estimu1ados durante 6 dias com derivados de proteina purificada (Protein Purified Derivative - PPD), M. tuberculosis virulento (Mtb). uma de M. ntberculosis inactivado pelo calor (hk Mtb) e sem antigenio (No Ag), foram recolhidos c a quantidade de IL-5 foi analisada por ELISA e expressa em pg/ml. A produyao media de lL-5 para cada grupo e representada
por barras horizontais.

com tuberculose pulmonar (Fig. 3 b), niio mostraram
estatisticamente significativas nos valores
em a todos os antigenios quando comparados
com o grupo controlo. Tal como nos individuos
saudaveis, PPD e Mtb vivo induziram a maior produ-yiio media de IL-5 nos doentes com tuberculose, enquanto que os Mtb inactivados pelo calor desenca-dearam a menor de IL-5.

DISCUSSAO

Os dados presentes demonstram que os dadores controlo e os doentes com tuberculose pulmonar forarn capazes de responder ao antigenio soluvel PPD, ao M. tuberculosis virulento e a preparayaO de M. tuberc[Jiosis inactivados pelo calor, embora com
diferentes graus de resposta. A e produ-

J ulho/ Agosto 1998

de IFN-y maxi mas forarn demonstradas quando as PBMC dos dadores saudaveis foram estimuladas com PPD e Mtb vivos. 0 Mtb hk induziu uma resposta mais fraca. embora todos os controlos e doentes tivessem respondido com valores acima dos das celulas niio estirnuladas. 0 envolvirnento do IFN-y na expressiio da resistencia adquirida a infecyiio tubercu-losa foi claramente demonstrado em modelos animais

por infecyiio com M. tuberculosis ou BCG em ratinho knockout para IFN-y ou receptor de IFN-y, a qual resultou na morte dos mesmos (15,16,17); no en tanto isto tern sido mais dificil de demonstrar na experimen-tayao humana in vitro. A secreyao de TFN-y nos humanos e geralmente assumida como tendo urn papel na irnunidade em relayiiO as infeCyOeS micobacterianas (18), e tern sido relatado que humanos homozig6ticos para uma mutayao pontual no gene I do receptor do IFN-y, a qual resulta na ausencia de expressao deste

Vol.IVNQ4 399

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA

receptor na superficie da celula, sao altamente suscep-tiveis de disseminar micobacterianas (19). Neste estudo tanto os dadores saudaveis como os doentes com tuberculose pulmonar desencadeararn respostas blastogenicas e de de lFN-y significativamente mais fortes em aos Mtb virulentos do que aos Mtb inactivados. A especffica contra o M. tuberculosis nos ratinhos e conferida pela inocula'YiiO com bacterias vivas, en-quanto que os organismos inactivados aumentam predominantemente a rcsisteneia nao especifica (20). Estas levam a por a hip6tese que ap6s a humana com Mtb, os bacilos sao ingeridos
por macr6fagos fagocitarios c prolifcram inicialmente dentro dos macr6fagos, cvitando-se a dos Mtb atraves da da fusao fagossoma-lisossoma nacelula hospedeira. Assim o macr6fago seria incapaz de degradar e processar os antigenios micobacterianos e utilizaria as proteinas exportadas ou secretadas pelos bacilos que proliferavam, para gcrar celulas T protec-toras. Logo, em anos rccentcs o interesse tern estado focado nas proteinas activamcntc secretadas e liberta-das a partir de M. tuberculosis virulentos em meio de cullura. As proteinas segrcgadas nos filtrados de culturas a curto prazo de Mtb mostraram ter forte potencial imunol6gico c induzir uma
celular T capaz de conter a infec'YiiO inicial e mediar a resistencia do hospedeiro (20.21). Logo, os nossos resultados sao semelhantes aos encontrados por outros invcstigadores, no seotido de que os Mtb vivos desen-cadeiam respostas Th1 mais potcntes do que as prepa-de Mtb inactivados pclo calor.
No presente estudo avaliamos as respostas imwlita-rias celulares em ao antigcnio soluvel PPD, Mtb vivos e Mtb hk em doentes com tuberculose pulmonar. Obsemimos existir uma proliferayao media reduzida dos PBMC estimulados com Mtb, Mtb hk e PPD (p=O.O l6) embora o ultimo nao fosse estatistica-mente significativo, enquanto a de resposta as de Mtb (p=0.009) e Mtb hk (p=O.O 16)
cram estatisticamente significativas nos doentes com tuberculose pulmonar quando comparados com os dadores saudaveis. Embora neste estudo a resposta

400 Vol. IV NQ4

blastogenica deprimida nos doentes com tuberculose pulmonar nao estivesse fortemente associada com uma diminuida de IFN-y, as respostas medias estavam em geral reduzidas quando comparadas com os individuos saudaveis, mas esses valores nao cram estatisticamente significativos. Isto pode sugerir que estes doentes com tuberculosc pulmonar, embora sobrecarregados com a rctem apesar de tudo a capacidade de montar rcspostas especificas de antigcnio e pode serum indicador da das bacterias devida ao inicio do tratamcnto. Todos os doentes com tuberculose pulmonar foram estudados ate a primeira semana ap6s o inicio do tratamento. E portanto possivel que muitas das celulas T antigenio especificas estejam conccntradas nos locais de

Estudos anteriores demonstraram que nos doentes com tuberculose, a de IFN-y (Thl) pelos PBMC estimulados com Mtb virulcntos cstava reduzi-da quando comparada com os dadores saudaveis vacinados com BCG (11). Esta cxpressao Thl dirninu-ida nao estava associada com a aumentada de IL-4 (Th2), a qual era semelhante em doentes com tuberculose e dadores controlo. No entanto, foi dcmonstrado que 0 numero de celulas secretoras de IFN-y nao estava deprimido nos doentes com tuber-culose pulmonar aetiva, e que a de lL-4 e mais frequente do que nos controlos (13). Neste estudo os doentes com tuberculose pulmonar eviden-
ciaram uma ligeira diminuic;ao da de fFN-y
e que a produyao de IL-5 ap6s estimulayao com Mtb virulento era semelhante as respostas induzidas pelos dadores controlo. No ratinho, a de lL-4 (Th2) e induzida sobretudo por micobacterias vivas mas nao pelas inactivadas (22). No nosso estudo as Mtb vi vas desencadearam de facto maior de

IL-5 do que a prepara9ao de Mtb inactivadas pelo calor, tanto nos doentes com tuberculose como nos dadores controlo saudaveis. Os dados obtidos oeste estudo nao sao a favor da hip6tese de urn a mudanya de tipo I para tipo 2 na tubercuJosa.
As diferenyas observadas entre os individuos saudaveis e os doentes com tuberculose pulmonar

Ju.lho/ Agosto 1998

RESPOSTAS THl E TH2 DESENCADEADAS POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VlRULENTO EM DOENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR

podem ter sido devidas a exposicyoes a diferentes
estirpes micobacterianas, uma vez que o BCG e o Mtb

partilham muitos antigenios comuns. Portugal e urna
regiao endemica para tuberculose, e as estirpes e

unidades de BCG usadas para vacinar a populacyao rem variado ao Iongo dos anos (23). Ha uma probabilidade alta de que os dadores e doentes em alguma fase da sua vida tenham tido urn contactado previo corn os bacilos Mtb. lsto pode explicar porque ha respostas medias reduzidas desencadeadas nos doentes com

tuberculose pulmonar, mas estas respostas nao estao muito suprimidas comparadas com as dos dadores saudaveis.

'CONCLUSOES

0 presente estudo demonstra que as PBMC dos doentes com tuberculose pulmonar estimuladas com PPD, Mtb e Mtb hk desencadeiam uma resposta proliferativa e uma producyao de IFN-y medias mais baixas do que as dos dadores saudaveis. Embora as respostas proliferativas estivessem reduzidas para o Mtb eo Mtb hk nos doentes com tuberculose, isto nao

significou urna significativa da produr,:ao de IFN-y quando comparada com os dado res controlo. Nao se verificou uma mudan9a no padrao das citoci-nas imunorreguladoras de urn tipo I dominante para urn tipo 2 dominante nos doentes com tuberculose pulmonar.

BffiLIOGRAFIA

I. DlREC<;AO GERAL DE SAUDE. Doencas de declaraclio obrigat6ria; 1980/1994.
2. RA VIGLIONE MC, REiDER HL, SNBLO K, KHOMENKO AG, ESTEVES K, KOCH1 A. Tuberculosis trends in Western Europe and the former USSR. Tubercle and Lung Disease 1984; 75:400-405.
3. RA VIGLIONE MC, SUDRE P, REIDER HL, SPlNACl S,

Julho/Agostol998

AGRADECIMENTOS

Gostariamos de agradecer ao Dr. D. Smith de London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK por gentilmente fornecer oM. tuberculosis H37 Rv. Gostariamos de agradecer aos seguintes Servicos e pessoal medico por terem fomecido as amostras dos doentes : Dr. Kamal Mansinho (Director), Dr. Carlos Araujo, Drs. Jaime Nina e Fernando Borges do Servico de lnfecciologia e de Medicina Tropical e Dr. Jose Pi menta da Graya, Dr". Silvia Sousa e DrA. Maria Francisca Moraes, do Servico de Medicina 11 e Dr. A. Fernandes (Direc-tor), Dru. Maria Jorge Arroz do Servico Patologia Clinica do Hospital de Egas Moniz, Lisboa, Portugal; e Prof. Ramiro Goulart Avila, Prof". Maria Joao Marques Go.mes e Dr•. Berta Mendes do Servico de Pneumologia l V. Hospital Pulido Valente, Lisboa, Portugal; DrA. Ana Barbado (Director) e Drl. Natalia Andre do Hospital Dr. Jose Maria Antunes Junior, Sarro, Torres Vedras, Portugal. Gostariamos de agradecer a nossa lnstituicao promotora Centro de Miliaria e Outras Doen<;as Tropicais (CMDT/IHMT/UNL) por providenciar apoio adminis-t:rativo, o Departamento de Microblologia do lHMT por providen-ciar apoio logistico laboratorial e ao Prof. J.L. Martins do Departa-mento de Clinica de Doen<;as Tropicais por providenciar urn gabinete de traba.Iho. Os autores agradecem a Sofia Costae Leonor Costa pelo auxilio na anAlise estatistica dos dados. Este trabalho foi subsidiado por uma bolsa da Comissao Europeia {N°ERB3 514PL961659). Diane Ordway tern uma bolsa para Doutoramento da PRAXJS XXlBD/9003/96.

Correspondencia:
Diane J. Ordway
Centro de Malaria e Outras Trop1cais/IMHTIUNL
Rua da Junqueira, 96
1300 Lisboa. Portugal.
Tel./ FAX : 00351 I 3622458. E-mail: cmdt@esoterica.pt

KOCH! A. Secular trends of tuberculosis in Western Europe. Bull WHO 1983; 71:297-306.
4. REIDER HL, ZELL WEGER JP, RA VlGIONE MC, KEIZER ST. M1GLIOR1 GB. Tuberculosis control in Europe and internation migration. European Respiratory Journal 1994; 7:1545-1550.

5. ROCHE PW, TRlCCAS JA, WINTER N. BCG vaccination

401

REVISTA PORTUGUESA DE PNEUMOLOGIA

against tuberculosis: past dissapointments and future hopes.: Trends in Microbiology 1995; 3:397-401.
6. SILVER RF, QlNG L, BOOM. H. ELLNER JJ. Lymphocyte--dependant inhibition of growth of virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv within human monocytes; requirement for CD4+ T ceUs in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative The Journal oflmmunology 1998; 160:2408-2417.
7. LALVANl A. BROOKS R, WILKlNSON RJ. MALIN AS. PATl-lAN AA. ANDERSEN P, DOCKRELL l·l. PASVOL G. HlLL A VS. Human cytolytic an.d interferon-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. Proceedings of the National Academy of Science 1998; 95:270-275.

8. MOSMANN TR, SAD S. The expanding universe ofT-cell subsets: Thl, Th2 and more. Immunology Today 1996: 17:138-146.

9. MOSMANN TR, COFFMAN RL. TH I and TH2 cells: different panems of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review Immunology 1989; 7:145-149.

10. ZHANG M, LIN Y. IYER l)V, GONG J, ABRAMS J, BARNES P. T cell cytokinc responses in human intection with Mycobacterium tuberculosis. Infection and lmmunity 1995; 63:3231-3234.
ll. JOHNSON BJ. MCMURRAY ON. Cytokinegeneexpression by cul.ture of human lymphocytes with autologous Mycobac· teriwn tuberculosis-infected monocytcs. Infection and Immunity 1994: 62:1444-1450.
12. SANCHEZ FO, RODRiGUEZ Jl. AGUDELO G, GARCIA LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. Infection and Immunity 1994; 62: 5673-5678.
13. SURCELHM, TROY-BLOMBERG M, PAULlES. ThlfTh2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. Immunology 1994; 81:171 -176.
14. SILVEIRA H, ORDWAY D, DQCKRELL H, JACKSON M. VENTURA F. Cell mediated immune responses to mycobac-terial antigens in patients with pulmonary tuberculosis and
HIV infection. Clinical and Experiment Immunology 1997;

402 Vol.lVNR4

110:26-34.

15. BANERJEE DK, SHARP AK, LOWRlE DB. The effect of gamma-interferon during Mycobacterium bovis (BCG) infection in athymic and euthymic mice. Microbial Pathologia 1986; I :221 -229.
16. FLYNN JL, CHAN J, TRJEBOLD KJ, DALTON OK, STEWART T A, BLOOM BR. An essential role for interferon-y in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. JoumaJ ' of Experimental Medicine 1993; 178:2249-2254.

17. KAMIJO RJ, LE J, SHAPIRO D, HA YELL EA, HUANGS S, AGUET M, BOSLAND M. VILCEK J. Mice that Jack the interferon-y receptor have profoundly al!ered responses to infection with bacillus and subquent challenge with lipopolysaccharide. Journal of Experimental Medicine 1993; 178:1435-1440.
18. MENDEZ-SAMPERJO P, GONZALES-GARCIA L, PINEDA-FRAGOSO PR, RAMOS-SANCHEZ E. Specificity ofT cells in humans resistance to Mycobacterium tuberculo-SIS infection. Celllmmunology 1995; 162: 194-201.
19. NEWPORT MJ, HUXLEY CM, HUSTON S, HA WRYLO-WICZ CM. OOSTRA BA. WILLJAMSON R, LEVIN M. A mutation in the interferon-y-receptor gene and susceptibility to mycobacteria.! infection. New England Jouranl of Medicine 1996: 335:194 1-1949.

20. ORME IM. Characterists and speecificity of acquired immu-nologic memory to Mycobacterium tuberculosis infection. Journal of immunology 1988; 140:3589-3593.
21. BOESEN H. JENSEN BN. WJLCKE T. ANDERSEN P.

Human T-cell responses to secreted antigens fra.ctions of Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity 1995; 63:149 1-1497.

22. HOOK S. GRtrFIN F. MACKINTOSH C, BUCHA G. Activation of an interleukin-4 mRNA-producing population of peripheral blood mononuclear cells after infection with Mycobacterium bovis or vaccination with killed, but not live BCG. immunology 1996; 88:269-274.
23. BRUM L, GOMES MJ, MENDES B, PESTANA E, AL-FARROBA E. DAVlD EH. Ensaio da no homen da de Mantoux usando 2 UT da tuberculina RT23. Rev. Port. Pneumol. 1996; II (6): 387-392.

Julbo/Agostol998