

RESPOSTAS IMUNO-CELULARES A ANTIGÉNIOS MICOBACTERIANOS*

D. ORDWAY, M. F. MORAES, L. OLIVEIRA, R. BADURA, M. NIZA PINHEIRO, J. M. PIMENTA GRAÇA, L. CARVALHO, T. SALDANHA, P. ABECASIS, F. A. A. N. VENTURA
Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais / IHMT e Hospital Egas Moniz. Lisboa.

RESUMO

Os autores estudaram a resposta imunológica, antes e após o início da terapêutica antibacilar, num doente de 22 anos, de raça negra, natural da República de Cabo Verde, VIH negativo, com tuberculose óssea com disseminação para os tecidos subcutâneos. Como marcadores imunológicos de reconhecimento de antígenos, foi testada a resposta linfoproliferativa em resposta a um painel de antígenos, a resposta citolítica específica de linfócitos T contra macrófagos autólogos apresentadores de 30 kD, 65 kD, proteínas de filtrado de culturas de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* (H37Rv) e PPD. Foi ainda avaliada a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por estas células para o sobrenadante da cultura celular com o objectivo de caracterizar o papel das citocinas durante a infecção micobacteriana. Observou-se um aumento da proliferação linfoblástica e da produção de g-IFN em resposta ao PPD e às Proteínas do Filtrado de Cultura de curto prazo (ST-CFP) após o primeiro mês de terapêutica. Mais significativo ainda foi o aumento da resposta dos linfócitos T citolíticos *M. tuberculosis* e PPD-específicos após um mês de tratamento. Após 6 meses de tratamento as respostas blastogénicas e a produção de γ -IFN ao painel antigénico foram consideravelmente mais elevadas. Observámos, que quer as ST-CFP quer as Proteínas do Filtrado de Cultura de médio prazo (MT-CFP) induzem aumentos na resposta proliferativa e na produção de g-IFN, confirmando a sua importância nas respostas protectoras imunitárias ao *M. tuberculosis*. As baixas respostas imunitárias no sangue periférico deste doente provavelmente reflectem apenas a elevada actividade imunitária no local da infecção. A grave disseminação da infecção micobacteriana pode estar relacionada com factores nutricionais ou sociais, ou representar um exemplo de diminuição da resistência inata à tuberculose.

SUMMARY

Cellular Immune Response to Mycobacterial Antigens in a Patient with Disseminated Tuberculosis

The authors studied the immunological response before and after beginning anti-tuberculous therapy, of a previously healthy, HIV negative, 22 year old black male, from the Republic of Cape Verde. The patient had multiple vertebral bony lesions associated to subcutaneous abscesses. As immunological markers of antigen recognition, we measured blastogenic and cytotoxic responses and γ -IFN secretion towards 30 kD, 65 kD, filtrate proteins of *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* (H37Rv) and PPD cultures. To characterise the role of cytokines during infection, expression of mRNA for γ -IFN, IL-4 and IL-10 was also analysed. A slight increase of lymphocyte proliferation and γ -IFN production was seen in response to purified protein derivative (PPD) and short term culture filtrate proteins (ST-CFP), after one month of therapy. More significant, was the increase in *M. tuberculosis* and PPD-specific cytolytic T lymphocyte response after one month of treatment. After 6 months of treatment, blastogenic and cytotoxic responses and γ -IFN production were considerably higher toward the antigen panel. The CD4/CD8 ratio

*Trabalho financiado pela JNICT (PBIC/S/SAU/1549/92), União Europeia (TS3-CT93-0245), Comissão Nacional de Luta Contra a Sida (001074) e JNICT (PRAXIS XXII/BD/9003/96).

increased from 0.7 to 1.4 after treatment. We observed that ST-CFP and MT-CFP induced increasingly higher lymphoproliferation and γ -IFN production, confirming their role in the protective immune responses to *M. tuberculosis*. The reduced immune responses in the peripheral blood of this patient probably reflect a high activity in the local sites of infection. This case of disseminated tuberculosis infection maybe related to nutritional or social factors or may represent an example of reduced innate resistance against tuberculosis infection.

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é a maior causa de morte mundial devido a um agente infeccioso e estima-se que o número de novos casos aumente de 7,5 milhões em 1992 para 10,2 milhões no ano 2000¹. A extensão do problema varia de região para região, mas na Europa Ocidental, Portugal tem a mais alta taxa de TB, 53 por 100 000 habitantes². A resposta imunitária perante contacto com o *Mycobacterium tuberculosis* depende em primeiro lugar da capacidade microbicida do macrófago alveolar que ingere o bacilo³. Se o bacilo sobrevive, cresce lentamente dentro dos macrófagos não activados até que a resposta imune citotóxica destrói os macrófagos e tecido circundante, formando o caseum central do granuloma. No caseum sólido, os bacilos podem sobreviver mas não se multiplicam e quando penetram nos tecidos circundantes, são rapidamente ingeridos por macrófagos, que se activados, ingerem e destroem o bacilo⁴. Para a maioria dos doentes com uma resposta imune normal, a infecção inicial é contida e passa despercebida. Se no entanto, os macrófagos não forem activados, os bacilos multiplicam-se, o caseum aumenta e pode liquefazer. Os bacilos têm a propriedade de se poder reproduzir no caseum líquido e assim a infecção torna-se activa e pode disseminar⁴. O macrófago activado efectua mais eficientemente as suas funções, nomeadamente a fagocitose, a digestão e a morte das micobactérias, a secreção de citocinas e o processamento de antigénios. Na resposta imune celular, os linfócitos T são responsáveis pela produção de linfoquinas que activam os macrófagos e pela citólise específica de macrófagos que contêm o bacilo. As células T helper 1 (Th1) produzem Interferão- γ (IFN- γ) e Interleucina-2 (IL-2) que aumentam a actividade microbicida dos macrófagos. As células T helper 2 (Th2) produzem Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-6 que por sua vez aumentam as respostas imunes humorais. Tanto as células Th1 como as células Th2 produzem Interleucina-10 (IL-10), que inibe a proliferação de ambas subpopulações de células e a produção de citocinas⁵.

Sabe-se que a secreção de IFN- γ desempenha um importante papel na protecção contra as infecções

micobacterianas humanas⁶. Assim, preparações que desencadeiem fortes respostas proliferativas e simultaneamente produção de IFN- γ , incluem certamente importantes antigénios reconhecidos pelas células T. Existe um grande número de antigénios micobacterianos disponíveis (somáticos e secretados), que foram avaliados em diferentes populações humanas quanto às suas capacidades imunogénicas. As proteínas secretadas e detectadas precocemente nos filtrados de cultura do *M. tuberculosis*, mostraram um potencial imunogénico desencadeante de uma resposta protectora de células T, capaz de conter a infecção inicial e mediar a resistência do hospedeiro^{7,8}. O potencial imunológico destes antigénios secretados parece representar a infecção micobacteriana, conferindo protecção, enquanto que os antigénios de organismos mortos não o fazem⁹. As proteínas de choque térmico (heat shock proteins - hsp) também demonstraram capacidades para induzir respostas blastogénicas em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) quer em dadores sãos quer em doentes com TB. Uma das hsp, a proteína de 65 kD tem sido apresentada em vários estudos^{10,11} como um antigénio imunodominante do *M. tuberculosis*, contudo outros trabalhos não encontraram proliferação linfocitária em resposta a esta proteína em indivíduos saudáveis reactivos à tuberculina¹². Embora seja claro que um grande número de proteínas micobacterianas seja capaz de induzir respostas imunes, torna-se necessário avaliar a relativa importância de cada antigénio. Existe um hiato no nosso conhecimento quanto à identificação de quais os antigénios protectores chave do *M. tuberculosis* responsáveis pela indução de células T mediadoras da imunidade protectora e de um estado prolongado de memória imunológica.

A resistência natural a uma infecção primária por *M. tuberculosis*, depende de factores ambientais, nutricionais, sociais e genéticos que afectam a interacção inicial do linfócito T e do macrófago, responsáveis pela resposta protectora e subsequente resolução da doença. Na Europa, onde a epidemia teve início há cerca de 400 anos, a tuberculose manifestava-se predominantemente como uma doença pulmonar crónica, verificando-se um

declínio progressivo na sua prevalência e incidência até ao início da epidemia causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Em contraste, nas populações apenas expostas à tuberculose desde há um ou dois séculos, tal como ocorre no Continente Africano, a tuberculose frequentemente causa uma doença aguda e fulminante caracterizada por disseminação hematogénea. É provável que o mecanismo de selecção natural de Darwin se aplique à interacção da tuberculose com o Homem. Se o microorganismo produziu uma alta mortalidade para o hospedeiro em idade fértil apenas os sobreviventes resistentes se reproduziram. Ao longo de muitas gerações são seleccionados indivíduos resistentes¹³. No ratinho, a resistência à infecção pelo *Mycobacterium bovis* é controlada pela presença de um gene denominado Bcg¹⁴. Este gene reduz marcadamente o crescimento do bacilo ao regular o grau de activação do macrófago. O facto de ter sido encontrada no ser humano, uma sequência homóloga no cromossoma 2, leva a pensar que possa ser responsável pela resistência inata à tuberculose que existe nas populações expostas a esta doença desde há longa data¹⁵. Outras investigações sugerem também que a susceptibilidade a muitas doenças infecciosas, incluindo tuberculose, é decorrente do *make-up* genético individual¹⁶⁻¹⁸. A evidência mais forte para a teoria da base genética da resistência às infecções micobacterianas e nomeadamente à TB ocorreu, quando em Lubeck, em 1927, crianças acidentalmente imunizadas com uma única estirpe viável virulenta de *M. tuberculosis* mostraram diferenças na susceptibilidade à TB que oscilou entre a morte e a recuperação total, com maior grau de concordância de TB entre os gémeos monozigóticos que entre os gémeos dizigóticos¹⁹.

Como marcadores imunológicos de reconhecimento de antígenos, no doente e num grupo de controlos, foi testada a resposta linfoproliferativa em resposta a um painel de antígenos, a resposta citolítica específica de linfócitos T contra macrófagos autólogos apresentadores de 30 kD, 65 kD, proteínas de filtrado de culturas de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* (H37Rv) e PPD. Foi ainda avaliada a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por estas células para o sobrenadante da cultura celular com o objectivo de caracterizar o papel das citocinas durante a infecção micobacteriana.

DESCRIÇÃO DO CASO CLÍNICO

Doente de 22 anos, sexo masculino, raça negra, natural e residente na República de Cabo Verde, enviado para Portugal ao abrigo de um Acordo no Domínio de Saúde.

Foi internado no Serviço de Medicina II do Hospital de Egas Moniz em Dezembro de 1996. Encontrava-se em bom estado de saúde aparente até Abril de 1996 quando referiu aparecimento insidioso de tumefacção dolorosa no dorso da mão direita e punho adjacente. Nos meses seguintes surgiram lesões de características semelhantes, no punho esquerdo, joelho esquerdo, dorso dos pés, tornozelos, cotovelos, partes moles dos antebraços e região lombar direita. As lesões dos punhos e dorso dos pés ulceraram espontaneamente e drenaram pus, descrito como "leite condensado". O exame objectivo revelou um doente emagrecido com tumefacções dolorosas de conteúdo líquido e aumento da temperatura local, com dimensões de 10 por 5 cm, localizadas nas partes moles da face dorsal dos antebraços (*Figura 1*), região lombar

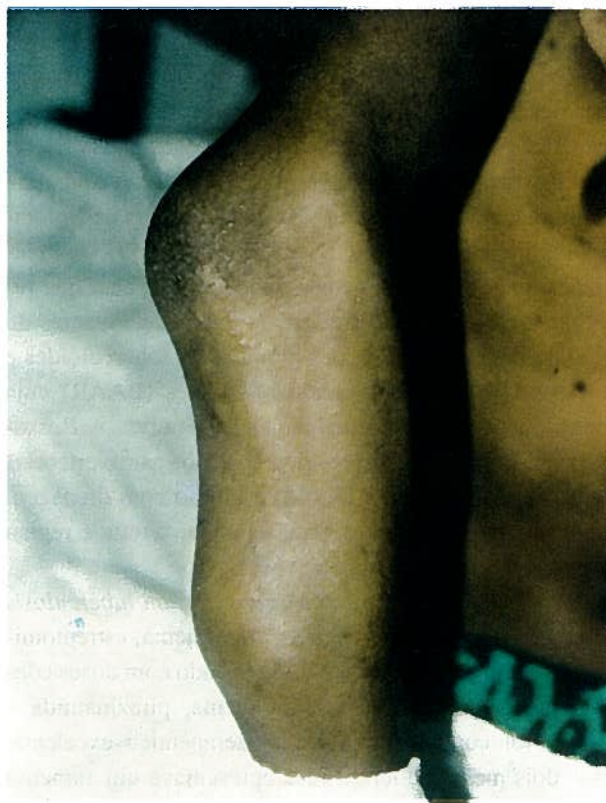


Fig 1 - Abscesso de partes moles na região do antebraço direito

direita (*Figura 2*) e em localização para-articular relativa aos joelhos, tornozelos e cotovelos com consequente impotência funcional. Apresentava cicatriz na face lateral do braço esquerdo sugestiva de prévia imunização com a vacina BCG. O teste de Mantoux foi anérgico. Os exames complementares de diagnóstico revelaram anemia (Hb 12 g/dl), microcítica e hipocrômica, leucócitos $10,10 \times 10^9/l$ (neutrófilos 81,4 %, linfócitos 6,8 %), HbA 58,1 %, HbA2 29 % e HbS 39 %, ferritina normal, VS 131, PCR aumentada (12 vezes o limite superior do nor-



Fig 2 - Abcesso na região lombar direita.

mal), hipoalbuminemia (2,73 g/dl), hipergamaglobulinemia policlonal (2,94 g/dl) à custa de IgG aumentado (31,5 g/l) e cicatriz imunológica de infecções pelos Vírus da Hepatite A, Hepatite B e Citomegalovirus. Não se verificaram alterações das provas de função renal ou hepática nem foram detectados anticorpos anti-VIH 1 e 2. O estudo das populações linfocitárias revelou uma diminuição acentuada de todas as subclasses de linfócitos particularmente dos CD3 e CD4 (*Quadro 1*). Foi realizada uma biópsia da parede do abscesso lombar que revelou focos de necrose rodeados de células gigantes do tipo de Langhans, pequenos granulomas tuberculóides e escassos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) cuja pesquisa no pus foi repetidamente negativa. A Ressonância Magnética (RM) revelou abscessos para-vertebrais de C6 a D2 e de D7 a D11, este último com drenagem através dos psosas, para a região lombar direita e região inguinal esquerda (Figura 3).

A cultura de pus revelou *Mycobacterium tuberculosis* complex, sensível à isoniazida, rifampicina, estreptomina e etambutol. O doente foi medicado com doses convencionais de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol com uma resposta à terapêutica excelente. Aos dois meses de terapêutica apresentava um aumento

Quadro 1 - Contagem de Linfócitos T e B (por microlitro efectuada por citometria de fluxo, antes (A) e nos meses após o início da terapêutica

	A	1M	2M	6M
CD3+	534	1054	1348	832
CD4+	293	576	531	445
CD8+	224	424	750	312
CD16+, CD3-	112	206	476	142
CD4+/CD8+	1,3	1,4	0,7	1,43

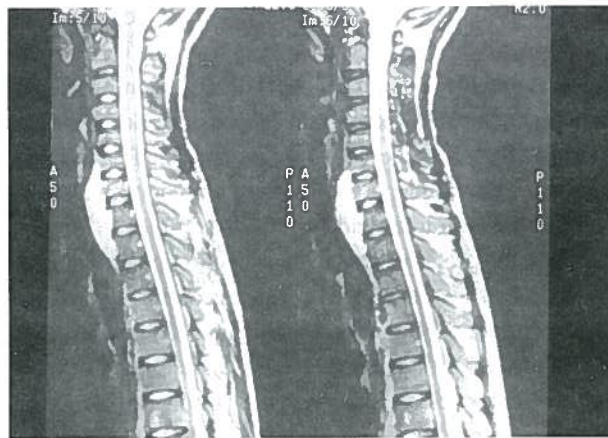


Fig 3 - RM cervical: sequência ponderada em T2 mostra alteração da morfologia e intensidade do sinal de C7 com abscesso adjacente.

de peso significativo, cicatrização das úlceras cutâneas, desaparecimentos dos abscessos subcutâneos e da região lombar e a TAC revelava abscessos paravertebrais de menores dimensões.

MATERIAL E MÉTODOS

Dadores de Controlo: Para controlo dos resultados obtidos no doente apresentado, foram estudados 12 dadores saudáveis, vacinados pela BCG, com resposta cutânea à tuberculina positiva, sem história prévia de tuberculose e seronegativos para o VIH.

Antígenos:

a) Purified Protein Derivative (PPD) batch RT44 foi adquirida do Statens Seruminstitut, Copenhaga e utilizada numa concentração final de 10 e 20 mg/ml.

b) O antígeno purificado 30 kD, foi amavelmente cedido pela colega Abou-Zeid, St. Mary's Hospital, London, e utilizado numa concentração final de 5mg/ml.

c) O antígeno recombinante *M. bovis* BCG 65 kD, foi obtido da Organização Mundial de Saúde, o colega Singh, Braunschweig, WHO IMMYC Antigen Bank, e utilizado numa concentração final de 10 mg/ml.

d) *Mycobacterium tuberculosis* sonicado (MtbS) foi preparado a partir de Mtb H37Rv morto por calor e cedido amavelmente por J. Belisle, Colorado State University, USA. O MtbS foi preparado por sonicação da bactéria em três ciclos de 10 minutos (min.), seguido de congelamento da suspensão e posterior centrifugação a 25000 g durante 30 min. O sobrenadante foi dividido em bijoux e armazenado a -20°C. MtbS foi utilizado numa concentração final de 5 mg/ml.

e) Proteínas do filtrado de cultura obtidas a curto prazo e a médio prazo do H37Rv (Short Term - Culture Filtrate Proteins, ST-CFP e Mid Term - Culture Filtrate Proteins,

MT-CFP), foram amavelmente cedidas respectivamente por P. Andersen, Statens Seruminstitut, Copenhaga e por Belisle, Colorado State University, e utilizadas numa concentração final de 5 mg/ml.

Todos os antígenios foram testados para determinar a concentração ótima para utilização

Mitogénio: O mitogénio fitohemaglutinina (PHA) (Difco, Detroit Michigan, USA) foi utilizado como controlo positivo numa concentração final de 8 mg/ml.

Bactérias: Mtb H37Rv doada pelo colega D. Smith, London School of Hygiene & Tropical Medicine cresceu em caldo de 7H9 enriquecido com glicerol e ADC (Bacto, Difco, Detroit, Michigan, USA). As culturas cresceram a 37°C num agitador orbital até à fase de *mid-log*, e posteriormente divididas e congeladas a -70°C. Cada estirpe foi passada em meio menos de três vezes desde a colheita original. A relação de Mtb H37Rv/células utilizada para induzir a máxima proliferação foi testada utilizando diluições bacterianas sequenciais nos alvéolos. A proliferação máxima foi observada quando a relação de número de bactérias/CMSP foi de 1:1.

Testes de Proliferação Linfoblástica: Isolaram-se CMSP do sangue heparinizado e separadas por gradiente de densidade (Histopaque Ficoll). O método utilizado na realização do ensaio corresponde ao descrito por Silveira et al²⁰. As células foram estimuladas com um painel de antígenios e PHA. A radioactividade incorporada foi medida num contador de radiação LS 6500 (Beckman) e expressada em contagens/minute (cpm). Os resultados de proliferação linfoblástica foram expressos como média de cpm dos triplicados menos a média da cpm dos alvéolos sem antígeno. A resposta a um dado antígeno foi considerada positiva se existisse uma média >2500 cpm e um índice de estimulação (SI) >3.

Teste de citocinas: A quantidade de IFN-g presente em cultura foi analisada por ELISA comercial (PharMingen, San Diego, CA, USA). Os sobrenadantes foram colhidos de culturas paralelas ao 6º dia, armazenados a -20°C e analisados posteriormente de acordo com as instruções do fabricante.

Ensaio de Citotoxicidade: Após desfibrinização do sangue periférico as CMSP foram isoladas por meio de um gradiente de densidade (Histopaque Ficoll). A concentração celular ajustou-se a 1×10^6 células/ml em meio de crescimento contendo penicilina e estreptomina. As células efectoras prepararam-se incubando 2×10^6 células com o antígeno em placas de cultura celular de 24 alvéolos durante sete dias. As células alvo prepararam-se cultivando amostras da suspensão celular

(150 ml) em placas de cultura celular de fundo redondo de 96 alvéolos. Assume-se que aproximadamente 10% das CMSP sejam monócitos, que se diferenciarão em macrófagos. Após 24 horas, as células não aderentes foram cuidadosamente retiradas por lavagem, permanecendo as células aderentes com meio de crescimento (100 µl) fresco. No 6º dia, as células alvo foram postas em contacto com o antígeno a estudar e marcadas com 51Cr (Amersham International PLC, Bucks, UK or ICN Pharmaceuticals INC, CA, USA) durante 18 horas. O excesso de antígeno e de 51Cr foi retirado, lavando os alvéolos três vezes em meio de crescimento pré-aquecido, permanecendo as células com meio de crescimento fresco. As células efectoras foram colhidas após sete dias de estimulação antígenica e resuspensas em meio de crescimento numa concentração de 10:1 da relação células efectora/célula alvo, e adicionadas em triplicado, em volumes de 100 ml aos alvéolos contendo os alvos já preparados. Foram utilizados controlos de meio e de células só com antígeno para controlo da libertação espontânea do 51Cr. Após 18 horas o conteúdo total de cada alvéolo (sobrenadante) foi transferido para tubos Ready Caps (Beckman, Inst. Fullerton, CA, USA). Para destruir as restantes células adicionou-se 150ml de SDS a 5% (BDH) a cada alvéolo (pellet), que foi posteriormente transferido para um segundo conjunto de tubos Ready Caps (Beckman, Inst. Fullerton, CA, USA). A actividade de cada tubo foi lida em contagens por minuto (cpm) utilizando um contador de radiação LS 6500 (Beckman) e a actividade específica calculada segundo a fórmula:

$$\% \text{ libertação do isótopo (IR)} = \frac{\text{cpm do sobrenadante} \times 100}{\text{cpm do sobrenadante} + \text{cpm da pellet}}$$

Libertação específica do isótopo = % IR dos alvéolos teste - % IR dos alvéolos de controlo.

Citometria de fluxo. Incubaram-se três tubos contendo 100ml de sangue total cada com 10ml de anticorpos monoclonais Trios (Ortho Diagnostics, Johnson e Johnson, Raritan, N.J., U.S.A.) marcados com três fluorocromos durante 20 minutos, à temperatura ambiente (tubo 1- controlo isotípico, tubo 2- CD4+/CD8+ e tubo 3- CD16+/CD19+/CD3+); após destruição dos eritrócitos contaminantes procedeu-se à aquisição das amostras num citometro de fluxo Ortho Cytron Absolute com o software Immunocount II. A análise das subpopulações linfocitárias baseou-se em janelas definidas no immunoscatter (fluorescência versus complexidade celular).

Expressão de mRNA de citocinas por CMSP: A expressão de citocinas de IL-4, IL-10, IFN- γ e β -actina foi analisada pela Reacção em Cadeia da Polymerase-transcriptase reversa (RT-PCR). Assim, CMSP ($2 \times 10^6/\text{ml}$) foram colocadas em placas de 24 alvéolos e estimuladas com PPD, MtbS e Mtb H37Rv vivo (1:1). Após 24 horas de cultura, as células foram colhidas, centrifugadas, resuspensas em RNazol B (Biogenesis, Poole, UK) e armazenadas a -70°C . O RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar foi sintetizado utilizando aproximadamente $1\mu\text{g}$ de RNA num total de $30\mu\text{l}$. A mistura de transcriptase reversa contendo 2mM dNTP, 200 U de transcriptase reversa do vírus da leucemia mamária do rato (GIBCO BRL, UK) e $1,5\mu\text{g}$ Oligo dT15 (Promega, Southampton, UK) e 3mg de Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma, Poole, UK), foi incubada a 37°C durante 1 hora e aquecida a 94°C por 5 min. para inactivar o enzima. O cDNA obtido foi amplificado por PCR usando primers de IFN- γ , IL-4, IL-10 e β -actina adquiridos de Clontech (Palo Alto, CA, USA). A mistura PCR continha 10mM de tampão Tris-HCL, $1,5\text{mM}$ MgCl₂, 50mM KCl, 2mM dNTP, $0,4\text{mM}$ primers oligonucleotidos 5' e 3' e $0,125\text{U}$ de Taq DNA polimerase (Boheringer-Mannheim, UK). A amplificação PCR foi efectuada num Techne PHC-3 termociclador durante 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min., com recozimento a 60°C por 2 min. e extensão a 72°C por 3 min.. Os produtos de PCR ($5\mu\text{l}$) correram em 1% de gel de agarose e a presença de produtos PCR específicos foi visualizada por luz ultravioleta.

Análise estatística: Os dados referentes aos controlos saudáveis foram apresentados graficamente em relação à média e desvio padrão. Foi utilizado o Teste T de Student para analisar os dados. Foi estabelecido o limiar de significância de $p < 0.05$.

RESULTADOS DOS TESTES IMUNOLÓGICOS

Respostas proliferativas aos antígenos micobacterianos e ao M. tuberculosis H37Rv. (Figura 4)

DADORES SAUDÁVEIS DE CONTROLO

As CMSP de 12 indivíduos mostraram em média uma proliferação máxima em resposta aos antígenos MT-CFP, 30 kD e PPD. As respostas proliferativas ao antígeno recombinante 65 kD e ao do *M. tuberculosis* H37Rv foram menos evidentes, embora estivessem significativamente aumentadas quando comparadas com as CMSP não estimuladas ($p < 0.05$) e a maior parte dos indivíduos demonstraram uma resposta positiva.

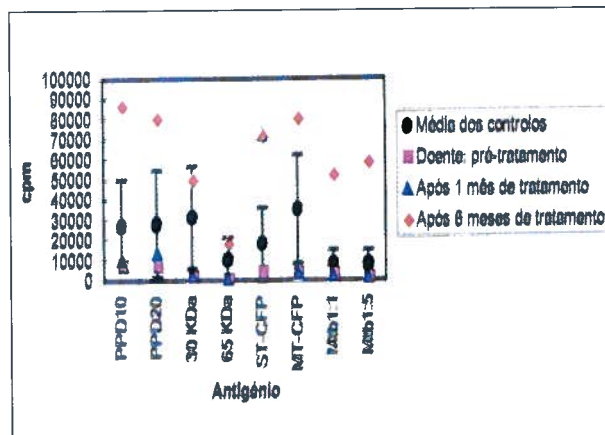


Fig 4 - Resposta linfoproliferativa aos diferentes antígenos do painel estudado, no doente antes e depois do tratamento, comparada com a resposta de 12 doadores saudáveis vacinados pela BCG.

DOENTE COM TB DISSEMINADA

Antes da terapêutica, as CMSP mostraram uma significativa redução na resposta proliferativa a todos os antígenos. Após um mês de tratamento notou-se um discreto aumento na proliferação linfocitária em resposta ao PPD (20 mg/ml), e um drástico aumento em resposta à ST-CFP. Após 6 meses de tratamento, as respostas proliferativas ao PPD, antígenos secretados (MT-CFP e ST-CFP) e *M. tuberculosis* H37Rv foram mais elevadas do que os resultados médios obtidos com os controlos. As respostas proliferativas ao antígeno secretado 30 kD e ao antígeno micobacteriano recombinante 65 kD foram mais fortes mas dentro dos resultados médios obtidos pelos controlos saudáveis. Tal como nos controlos, o antígeno recombinante foi menos eficaz a desencadear uma resposta proliferativa. O número de células T CD4+ (Quadro 1) do sangue periférico encontradas no sangue periférico variou entre 293 e 576, não existindo correlação entre este valor e a resposta antigénica.

Secreção de IFN- γ em resposta ao painel de antígenos (Figura 5).

DADORES SAUDÁVEIS DE CONTROLO

A secreção de IFN- γ em resposta ao painel de antígenos de 12 controlos foi consistentemente elevada quando as CMSP foram estimuladas com *M. tuberculosis* H37Rv, PPD, ST-CFP e MT-CFP, o que não aconteceu com o antígeno secretado 30 kD e com o antígeno recombinante 65 kD. Contudo, e ao contrário da resposta proliferativa, o antígeno 30 kD foi incapaz de desencadear em média, uma forte resposta do IFN- γ , comparativamente com o PPD, com as proteínas dos filtrados de cultura (ST-CFP e MT-CFP) ou com o *M. tuberculosis* H37Rv. Existiu uma maior

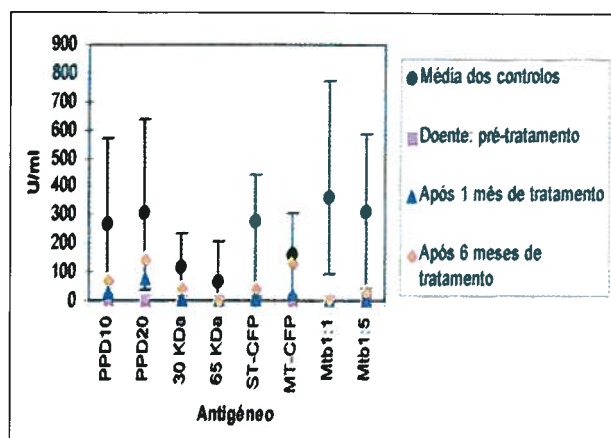


Fig 5 - Produção de IFN- γ em resposta aos diferentes antígenos do painel estudado, no doente antes e depois do tratamento, comparada com a produção de 12 doadores saudáveis vacinados pela BCG.

variabilidade entre a capacidade dos doadores para produzir IFN- γ do que a observada nas respostas proliferativas. No grupo controle, o *M. tuberculosis* H37Rv, induziu a máxima produção em média de IFN- γ .

DOENTE COM TB DISSEMINADA

A produção de IFN- γ pelas CMSP deste doente quando estimuladas, antes e após um mês de tratamento, foi mais baixa do que a dos controles, e em relação a todos os antígenos estudados, mostrando apenas um discreto aumento da produção de IFN- γ quando estimuladas pelo PPD (20 μ g/ml). Após seis meses de tratamento, as células estimuladas pelo PPD (20 μ g/ml) e pela MT-CFP mostraram a mais alta produção de IFN- γ . Embora também elevada, a produção de IFN- γ pelas células estimuladas pelo 30 kD, ST-CFP e pelo *M. tuberculosis* H37Rv, aos seis meses, foi mais baixa quando comparada com a produção média de IFN- γ obtida das células dos doadores de controle. O antígeno recombinante 65 kD permaneceu o menos eficaz na indução da produção de IFN- γ .

Respostas citotóxicas ao PPD e *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 6).

DADORES SAUDÁVEIS DE CONTROLO

Foram avaliados seis doadores de controle foram avaliados em relação à percentagem de resposta citolítica específica. A citólise específica média mais alta encontrou-se quando os macrófagos (células alvo-A), e os linfócitos (células efectoras-E) foram estimulados com o *M. tuberculosis* H37Rv (A:E de 1:1), *M. tuberculosis* (A:E 1:5) e PPD 10 μ g/ml.

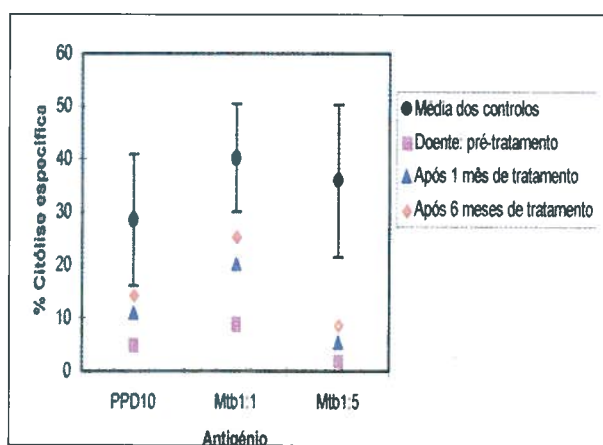


Fig 6 - Citotoxicidade específica em resposta ao PPD e *M. tuberculosis* no doente antes e depois do tratamento, comparada com a de 6 doadores saudáveis vacinados pela BCG

DOENTE COM TB DISSEMINADA

A citólise específica em relação ao PPD e ao *M. tuberculosis* foi a mais baixa antes do início do tratamento. Após um mês de tratamento, foi observada a mais alta percentagem de citólise específica quando as células A e E foram ambas estimuladas com *M. tuberculosis* H37Rv (A:E 1:1), embora também se tenham observado valores elevados em relação com o PPD e com o *M. tuberculosis* (A:E 1:5). Após seis meses de terapêutica, a percentagem de citólise específica observada foi mais elevada em relação a todo o painel antigénico, sendo o valor mais alto observado consistentemente em relação com o *M. tuberculosis* H37RV (A:E 1:1). No entanto, mesmo após os seis meses de tratamento a citólise específica das células alvo encontrava-se em geral abaixo dos valores médios observados nos doadores de controle.

Expressão pelas CMSP do mRNA das citocinas (Quadro II).

DADORES SAUDÁVEIS DE CONTROLO

A expressão das citocinas foi estudada nas CMSP de 4-6 controles. O mRNA do IFN- γ foi produzido pelas CMSP de todos os doadores de controle quando as células foram estimuladas com PPD ou PHA e apenas um não respondeu ao MtbS. As respostas ao *M. tuberculosis* H37Rv (vivo) foram observadas em três dos indivíduos testados. A expressão do mRNA da IL-4 e IL-10 foi observada apenas em alguns doadores de controle, e principalmente em resposta ao PHA.

DOENTE COM TB DISSEMINADA

Antes da terapêutica, este doente apenas apresentava expressão do mRNA do IFN- γ e unicamente em resposta ao PHA. Não se detectou expressão do mRNA da

Quadro II - Expressão de mRNA para INF- γ and IL-10

	INF- γ				IL-4				IL-10			
	PHA	PPD	MtbS	Mtb	PHA	PPD	MtbS	Mtb	PHA	PPD	MtbS	Mtb
Controlo	5/5	6/6	5/6	3/6	2/5	1/6	1/6	1/6	4/4	1/5	2/5	0/5
Antes	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Após 1 mês	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1
Após 6 meses	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

Foram testadas as CMSP dos controlos saudáveis Mantoux positivos e do nosso doente antes e depois do tratamento. As células foram estimuladas com PPD a 10 $\mu\text{g/ml}$, sonicado de *Mtb H37Rv* (MtbS) a 5 $\mu\text{g/ml}$, *Mtb H37Rv* vivo numa concentração de 1 bactéria para 1 CMSP ou PHA a 8 $\mu\text{g/ml}$. A expressão de mRNA de citocinas foi determinada por RT-PCR. Os valores representam o número de indivíduos com expressão de mRNA de citocinas / número total de indivíduos estudados.

IL-10 e o mRNA da IL-4 apenas se encontrou em resposta ao PHA. Após um mês de tratamento, encontrou-se expressão do mRNA do IFN- γ em resposta ao PHA e PPD. Não existia nas CMSP, mRNA da IL-4 em resposta ao painel antigénico, e o mRNA da IL-10 apenas se detectou nas células estimuladas pelo PHA e PPD. Após 6 meses de tratamento, o mRNA do IFN- γ foi positivo nas células estimuladas com PHA, PPD, Mtb.S, e *M. tuberculosis H37Rv*. Ainda aos seis meses, nunca se detectou mRNA da IL-4 em resposta ao painel antigénico e a expressão do mRNA da IL-10 apenas foi detectada em resposta ao PHA.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos e aqui apresentados mostraram que os doentes de controlo e o doente com TB disseminada foram capazes de responder embora em diferentes níveis, ao painel antigénico. A proliferação linfocitária máxima e a produção de IFN- γ foram observadas quando as CMSP dos doentes de controlo foram estimuladas com PPD, MT-CFP e ST-CFP. O antigénio recombinante 65 kD provocou uma resposta menos vigorosa talvez porque estes antigénios recombinantes podem ser menos antigénicos que a correspondente proteína nativa devido à existência de modificações chave pós-translacionais. O *M. tuberculosis H37Rv* mostrou baixos valores na resposta proliferativa, mas uma alta produção de IFN- γ , sugerindo que as células secretoras de IFN- γ não se expandem necessariamente ou que poderão pertencer a diferentes subpopulações linfocitárias.

No estudo do doente com TB disseminada, a produção do IFN- γ bem como as respostas proliferativas e citotóxicas encontravam-se diminuídas antes e após um mês de terapêutica. É possível que muitas das células T reativas aos antigénios micobacterianos específicos estivessem concentradas nos locais de infecção durante a fase aguda. Após seis meses de tratamento, os elevados valores proliferativos encontrados, bem como o aumento

da produção de IFN- γ podem estar relacionados com a recuperação do sistema imunitário que acompanharam a melhoria clínica observada no doente em estudo. A citólise específica das células alvo, foi mais elevada após os seis meses de tratamento, embora com valores mais baixos que os encontrados nos doentes de controlo. Mais uma vez, a compartimentalização das células responsáveis pode explicar estes valores.

A variação observada nas subpopulações de células T após um mês de tratamento, deve-se muito provavelmente ao regime terapêutico bactericida, que numa fase inicial reduz significativamente a carga bacteriana. Não existiu correlação entre a contagem de células T CD4+ e a resposta proliferativa, ou produção de IFN- γ , sugerindo que a variabilidade nestas respostas reflectem variabilidade no reconhecimento antigénico e na resposta imunitária. A queda da contagem de células T CD4+ encontrada após seis meses de tratamento não diminuiu a eficácia da resposta imune.

A dicotomia de produção de citocinas de tipo I e de tipo II, foi descrita em várias infecções, onde um tipo de resposta confere protecção e o outro está associado com doença²¹. Neste doente, observou-se uma depressão da resposta Th1 antes do início do tratamento, através da expressão do mRNA da IL-4 nas CMSP estimuladas com PHA. Esta expressão do mRNA da IL-4 desapareceu após um mês de terapêutica, não tendo também sido encontrada antes ou após o tratamento, expressão do mRNA de IL-4 em resposta a antigénios micobacterianos ou ao próprio *M. tuberculosis*. A expressão da IL-10 nas CMSP estimuladas com PHA ou com PPD após um e seis meses de tratamento, pode ter sido uma consequência de um aumento de concentração de citocinas pro-inflamatórias, numa tentativa de reduzir os níveis de IFN- γ . Assim, os nossos achados não apoiam a hipótese de uma troca entre a resposta tipo I para tipo II na infecção micobacteriana disseminada. São, contudo, sugestivos de uma reacção predominantemente do tipo

Th1 após o início da terapêutica, coincidente com a melhora clínica observada.

Considerando os dados encontrados neste estudo, concluímos que as proteínas do filtrado de cultura do *M. tuberculosis* H37Rv e os seus componentes têm um grande potencial imunogénico e devem continuar a ser estudados, com vista a futuras intervenções no domínio da imunologia, nomeadamente como componentes de uma futura vacina. Este doente com TB disseminada apresentou antes do tratamento, diminuição da resposta proliferativa linfocitária, da produção de IFN- γ e das respostas citolíticas específicas. Após um e seis meses de terapêutica, todos os ensaios imunológicos efectuados demonstraram uma recuperação da resposta imunitária. Uma elevada produção de citocinas antagonizantes, que activam ou desligam a função monócito/macrófago, são uma consequência de um sistema imunitário comprometido como observado pela expressão de IL-10. Embora seja fácil compreender como uma produção excessiva de um ou outro tipo de perfil de citocinas possa contribuir para a patogénese da infecção pelo *M. tuberculosis*, é sem qualquer dúvida necessário continuar este tipo de investigação para uma definição mais pormenorizada se este sinergismo de citocinas é na verdade o responsável pela progressão da doença. Estudos imunitários referentes à imunidade celular em indivíduos são vacinados pela BCG e reactivos à tuberculina, demonstram uma forma de imunidade protectora à infecção pelo *M. tuberculosis*. É razoável inferir que num dador saudável, uma diminuição deste tipo de respostas se encontre associado a um aumento do risco de infecção pelo *M. tuberculosis*. No nosso doente, com infecção activa, não podemos tirar esse tipo de conclusões, dado que as baixas respostas imunitárias no sangue periférico provavelmente reflectem apenas a elevada actividade imunitária no local da infecção. Mais ainda, embora factores nutricionais e sociais pudessem ter influído fortemente na capacidade de resistência do sistema imunitário, não se pode afastar a hipótese do nosso doente representar um exemplo de diminuição da resistência inata à tuberculose, geneticamente determinada e que possa ter sido responsável por uma diminuição da activação dos macrófagos face ao contacto inicial com o *M. tuberculosis*, que levou, por sua vez, à disseminação da infecção micobacteriana.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos seguintes médicos e departamentos médicos por providenciarem amostras de doentes e dadores são de controlo: Kamal Mansinho,

Carlos Araújo, Jaime Nina e Fernando Borges do Serviço de Doenças Infecciosas, Parasitárias e de Medicina Tropical; Margarida Cancela de Abreu e à sua equipa do Serviço de Pneumologia, do Hospital de Egas Moniz, Lisboa, Portugal. A Ramiro Ávila e Berta Mendes do Serviço de Pneumologia IV, do Hospital Pulido Valente, Lisboa, Portugal. Queremos ainda agradecer ao Director do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Egas Moniz, Andersen Fernandes e a Maria Jorge Arroz, toda a colaboração prestada para a realização da Citometria de Fluxo. Queremos também agradecer à nossa instituição de apoio, o Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais (CMDT/IHMT), pela assistência administrativa e ao Departamento de Microbiologia/IHMT pelo apoio laboratorial.

BIBLIOGRAFIA

- 1 DOLIN PJ, RAVIGLIONE MC, KOCHI A: Global Tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull. WHO* 1994; 72:213-220.
- 2 RAVIGLIONE MC, SUDRE P, RIEDER HL, SPINCI S, KOCHI A: Secular trends of tuberculosis in Western Europe. *Bull. WHO* 1993; 71:297-306.
- 3 DUNLAP N, BRILES D: *Immunology of Tuberculosis*. Medical Clinics of North America 1993; 77 (6):1235-1251.
- 4 DANNENBERG AM: Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology* 1994; 191 (4-5):461-73.
- 5 DEL PRETE GF, DE CARLI M, ALMERIGOGNA F, GIUDIZI MG, BAGOTTI R, and 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* 1993; 150:353-360.
- 6 BARNES PF, MODLIN ML: Human cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1996; 215:297-319.
- 7 ANDERSEN P, ANDERSEN AB, SORENSEN AL, NAGAI S: Recall of longlived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J. Immunol* 1995; 154:3359-3372.
- 8 BOESEN H, JENSEN BN, WILCKE T, ANDERSEN P: Human T-cell responses to secreted antigens fractions of Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun* 1995; 63:1491-1497.
- 9 ORME IM: Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immuno* 1988; 140:3589-3593.
- 10 EMMRICH F, THOLE J, van EMBDEN J; KAUFMANN SH: A recombinant 64 kD protein of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin specifically stimulates human T4 clones reactive to mycobacterial antigens. *J. Exp. Med* 1986; 163:1024-1029.
- 11 MENDEZ-SAMPEIRO P, GONZALEZ-GARCIA L, PINEDA-FRAGOSO PR, RAMOS-SANCHEZ E: Specificity of T cells in human resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Cell. Immunol* 1995; 162:194-201.
- 12 HAVLIR DV, WALLIS W, BOOM H, DANIEL TM, CHERVENAK K, ELLNER JJ: Human Immune response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Infect. Immun* 1991; 59:665-670.
- 13 BATES J; STEAD W: The history of tuberculosis as a global epidemic. *Medical Clinics of North America* 1993; 77 (6):1205-1218.
- 14 SKAMENA E: The Bcg gene story. *Immunobiology* 1994; 191 (4-5):451-60.
- 15 BLOOM BR: Tuberculosis pathogenesis, protection and control, ASM Press, Washington, DC, 1994:420-422.
- 16 MOTULSKY AG: Human genetics. Raven Press, Inc., New York,

1979:28.

17 SKAMENE E: Genetic Control of Resistance to Mycobacterial Infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1986; 124:49-66.

18. COMSTOCK GW: Tuberculosis in Twins: a reanalysis of the Proffit Survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978; 117:621-624.

19 ANONYMOUS: *Die Sauglingstuberkulose in Lubeck.* Julius Springer, Berlin, 1935.1.

20 SILVEIRA H, ORDWAY D, DOCKRELL H, JACKSON M, VENTURA F: Cell-mediated immune responses to mycobacterial antigens in patients with pulmonary tuberculosis and HIV infection. *Clin. Exp. Immunol* 1997; 110 (1):26-34.

21 MOSNANN TR, SAD S: The expanding universe of T-cell subsets: TH1, Th2 and more. *Immunol. Today* 1996; 17:138-146.