

LONDON
SCHOOL of
HYGIENE
& TROPICAL
MEDICINE



Ordway, DJ; Martins, MS; Costa, LM; Freire, MS; Arroz, MJ; Dockrell, HM; Ventura, FA (2005) [Increased IL-4 production in response to virulent *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients with advanced disease]. *Acta medica portuguesa*, 18 (1). pp. 27-36. ISSN 0870-399X

Downloaded from: <http://researchonline.lshtm.ac.uk/11558/>

DOI:

Usage Guidelines

Please refer to usage guidelines at <http://researchonline.lshtm.ac.uk/policies.html> or alternatively contact researchonline@lshtm.ac.uk.

Available under license: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/>

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE IL-4

Resposta ao *Mycobacterium tuberculosis* virulento em doentes com tuberculose em estágio avançado

DIANE J. ORDWAY, MARTA S. MARTINS, LEONOR M. COSTA, MÓNICA S. FREIRE, MARIA J. ARROZ, HAZEL M. DOCKRELL, FERNANDO A. VENTURA

Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais/Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Hospital Egas Moniz. Faculdade de Ciências Médicas. Lisboa. Portugal. Immunology Unit, London School of Hygiene & Tropical Medicine. London. UK.

RESUMO

O objectivo deste estudo foi o de comparar as respostas imunes ao bacilo e antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos portugueses saudáveis e em doentes com tuberculose pulmonar (TB), bem como efectuar uma correlação do estado imunitário e da gravidade clínica da doença tuberculosa. As células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram cultivadas e estimuladas com *M. tuberculosis* H37Rv e com um derivado de proteína purificado (PPD) e a produção de IFN- γ e de IL-4/IL-5 foi quantificada através das técnicas de ELISA e de citometria de fluxo multi-parâmetros. As CMSP de 30 doentes com tuberculose demonstraram um decréscimo significativo na proliferação e produção de IFN- γ , quando estimuladas com *M. tuberculosis* vivo comparativamente com o grupo controlo. Dos 15 doentes com tuberculose estudados e após estimulação com *M. tuberculosis*, sete demonstraram um grande aumento na produção de IL-4 intracelular pelas células T CD8+ e $\gamma\delta$ +. Os doentes com tuberculose demonstraram um aumento de IL-4 intracelular após as CMSP serem estimuladas com *M. tuberculosis* vivo, nomeadamente do fenótipo CD4+, mas mais notavelmente do subtipo CD8+ and $\gamma\delta$ TCR+. O aumento da produção de IL-4 em doentes com tuberculose, verificou-se em indivíduos com um envolvimento avançado do parênquima pulmonar apresentando grandes cargas bacterianas nas expectorações. Estes resultados sugerem que pode ocorrer uma alteração no equilíbrio das citocinas tipo 1 e tipo 2, em doentes com tuberculose que se encontrem num estágio clínico avançado da doença.

Palavras-chave: Tuberculose, Proliferação linfocitária, Interferão- γ , Interleucinas

SUMMARY

INCREASED IL-4 PRODUCTION IN RESPONSE TO VIRULENT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN TUBERCULOSIS PATIENTS WITH ADVANCED DISEASE

The study was designed to compare immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and antigens in healthy Portuguese subjects and pulmonary tuberculosis patients (TB), and to correlate immune status with clinical severity of tuberculosis disease. PBMC were cultured and stimulated with live and killed *M. tuberculosis* H37Rv and purified protein derivative (PPD) and lymphoproliferation and production of IFN- γ and

Este trabalho foi financiado pela Comissão Europeia (IC18*CT970236), pela Comissão Nacional de Luta contra a SIDA (001074) e pela Fundação Calouste Gulbenkian, projecto Pesquisa de novos marcadores de imunidade celular para a detecção precoce da infecção por *M. tuberculosis*.

IL-5/IL-4 by these cultures were evaluated by the use of ELISA and multi-parameter flow cytometry. PBMC from 30 tuberculosis patients demonstrated significantly reduced amounts of proliferation and IFN- γ when stimulated with live *M. tuberculosis* compared the control group. Of 15 tuberculosis patients tested for intracellular IL-4 following stimulation with *M. tuberculosis*, 7 showed greatly increased IL-4 production in CD8+ and $\gamma\delta$ + T cells. Tuberculosis patients demonstrated an increase of intracellular IL-4 after PBMC were stimulated with live *M. tuberculosis* in the CD4+ phenotype, but more notably in CD8+ and gd TCR+ subsets. Increased production of IL-4 in tuberculosis patients was primarily in individuals with advanced involvement of lung parenchymal with high bacterial loads in sputum. These results suggest that an alteration in type 1 and type 2 cytokine balance can occur in patients with tuberculosis at an advanced clinical stage of disease.

KEY-WORDS: Tuberculosis (TB), Lymphocyte proliferation, Interferon- γ , Interleukins

INTRODUÇÃO

A tuberculose é um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, que tem vindo a agravar-se através do impacto do VIH e da multiresistência aos anti-bióticos. Em Portugal, a incidência da tuberculose pulmonar é a maior da Europa ocidental com o aparecimento de 40 novos casos por cada 100 mil habitantes¹, 2.5 vezes mais do que a média que se verifica na maioria dos outros países da Comunidade Europeia^{2,4}.

Em vários tipos de infecções, tem sido descrita uma dicotomia na produção de citocinas tipo 1 e tipo 2, em que um dos tipos de resposta confere protecção e o outro se encontra associado a doença⁵. Quando as CMSP de doentes com tuberculose foram estimuladas com *M. tuberculosis* vivo, verificou-se um decréscimo na produção de IFN- γ , no entanto, não se observou um aumento na produção de IL-4, nem sistémico, nem no local da doença, quando comparadas com indivíduos saudáveis reactivos à tuberculina⁶; no entanto, outros estudos demonstraram um aumento do número de células produtoras de IL-4, utilizando a técnica de ELISPOT⁷. Estudos recentes demonstraram que quando as CMSP de doentes com tuberculose são estimuladas com *M. tuberculosis* morto ou com *M. tuberculosis* H37Ra vivo, as células T CD4+⁸ ou CD8+⁹ demonstram um aumento na produção de IL-4, respectivamente. Na infecção tuberculosa, a maioria dos estudos que suportam uma resposta tipo 1 reduzida sem que se verifique um aumento na resposta tipo 2, têm sido localizados em países que apresentam uma baixa incidência deste tipo de infecção^{10,13}, enquanto que dados que suportam uma diminuição da resposta tipo 1 com um aumento da resposta tipo 2, têm sido obtidos em países endémicos

para esta doença^{8,9,14,15}. Indivíduos de países que são altamente endémicos para a tuberculose, quando expostos a cargas aumentadas de patógenos, como o *M. tuberculosis*, podem produzir quantidades aumentadas de citocinas tipo 2, resultando numa capacidade reduzida em despoletar respostas imunes efectivas a infecções recorrentes ou recentemente adquiridas. Alternativamente, estes resultados contraditórios podem dever-se às diferentes sensibilidades dos métodos experimentais, ou podem reflectir diferenças nos estádios da doença e patologias clínicas pulmonares dos doentes com tuberculose testados.

Um aumento das evidências suporta que o IFN- γ tem um papel preponderante na imunidade protectora contra a tuberculose. Em modelos de murinos, ratinhos incapazes de produzir IFN- γ ou o seu receptor, demonstraram uma susceptibilidade aumentada à infecção com *M. tuberculosis* ou com *M. bovis* Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)^{16,18}. Em humanos, indivíduos com uma deficiência no receptor do IFN- γ (IFN- γ R1), devido a uma mutação da cadeia de ligação de grande afinidade deste receptor, demonstraram uma susceptibilidade aumentada a infecções micobacterianas fatais¹⁹. Doentes com doença granulomatosa crónica demonstraram uma incidência reduzida de infecções bacterianas quando se administrou IFN- γ , no entanto, *in vitro*, a estimulação de fagócitos não demonstrou um aumento dos efeitos antibacterianos²⁰. Dados obtidos experimentalmente, demonstraram que as células T CD8+ de indivíduos vacinados com o BCG, podem ser activadas²¹ e produzirem IFN- γ ²² após uma estimulação *in vitro* com *M. bovis* BCG. Estes resultados sugerem que as células tipo 1 têm um papel importante nas defesas

humanas anti-micobacterianas. As células tipo 2 produzem IL-4, que pode inibir as respostas imunes através da desactivação de macrófagos e da redução da proliferação das células T^{23,24}. O balanço crítico da produção de citocinas inibitórias e estimuladoras pode ser necessário no ambiente local, de modo a promover um efeito anti-micobacteriano generalizado. No entanto, no caso da tuberculose, pode ocorrer um desequilíbrio nos perfis das citocinas tipo 1 e 2, conduzindo a uma imunodepressão e consequentemente ao desenvolvimento de doença.

Neste estudo o nosso objectivo foi o de avaliar as respostas das citocinas tipo 1 e 2 em CMSP de doentes com tuberculose pulmonar (TB) e em controlos saudáveis vacinados com o BCG, após estimulação com um derivado de proteína purificado (PPD) e com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv vivo e morto. Nós demonstrámos que as CMSP de doentes com tuberculose, estimuladas com *M. tuberculosis* vivo, apresentaram uma secreção de IFN- γ reduzida, em comparação com os dadores saudáveis. Utilizando técnicas de citometria de fluxo, demonstrámos que se verifica um aumento na produção de IL-4 intracelular, pelas células de doentes com tuberculose com uma forma avançada da doença e este aumento verificou-se com maior frequência nas células T CD8+ e $\gamma\delta$ do que nas células T CD4+. Apesar de poder ocorrer um decréscimo na produção das citocinas tipo 1, na ausência de uma mudança completa para a activação tipo 2, nós apresentamos evidências da activação de células produtoras de citocinas tipo 2 específicas de antígenos, se forem utilizados métodos sensíveis de detecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dadores

Este estudo incluiu indivíduos portugueses saudáveis vacinados com o *M. bovis* BCG, recrutados em Lisboa, Portugal, assim como os controlos expostos a antígenos micobacterianos, mas sem história prévia de tuberculose. Os 30 indivíduos incluídos neste estudo apresentavam idades compreendidas entre os 20 e 42 anos (idade média, 31.3 anos). Todos os dadores foram vacinados à nascença com o *M. bovis* BCG e apresentaram um teste de Mantoux, positivo (induração >5-10mm). Nesta população, o teste de Mantoux não é diagnóstico para a infecção por *M. tuberculosis*, mesmo quando se utilizam dadores que apresentam valores positivos, superiores a 10 mm²⁵. Os dadores saudáveis foram diagnosticados seronegativos, para a infecção por VIH-1 e VIH-2, através da técnica de ELISA. Os indivíduos incluídos neste estudo, não apresentaram nenhum sintoma clínico de desordens atópicas

ou infecções parasitárias ou por helmintes.

Foram ainda recrutados 30 doentes portugueses com tuberculose pulmonar activa, do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Serviço de Pneumologia e Serviço de Medicina II do Hospital Egas Moniz, Lisboa, Pneumologia IV do Hospital Pulido Valente, Lisboa e do Hospital Dr. José Maria Antunes Júnior, Torres Vedras. Os dadores incluídos neste estudo apresentaram idades compreendidas entre os 20 e os 50 anos (idade média, 35.1 anos) e todos (100%) tinham sido vacinados com o *M. bovis* BCG.

Os doentes com tuberculose pulmonar classe 3 clinicamente activa, com reactivação endógena da infecção latente²⁵, que foram seronegativos para a infecção VIH-1 e VIH-2, foram diagnosticados clinicamente por radiografia ao tórax e com confirmação por exame directo e/ou cultura de expectoração, secreções brônquicas ou lavagem bronco-alveolar. A maioria dos doentes representaram novos casos de tuberculose que não tinham recebido nenhuma terapia ou que tinham sido submetidos a um máximo de sete dias de quimioterapia, de acordo com as recomendações da OMS (terapia diária com isoniazida, rifampicina, etambutol, e pirazinamida). Não se observaram diferenças estatísticas na capacidade de resposta das CMSP dos doentes, em termos de proliferação e na produção de IFN- γ ou IL-5, se os testes foram efectuados antes do tratamento ou após cinco dias do início do tratamento (dados não mostrados). Os doentes com tuberculose foram posteriormente, subdivididos de acordo com o estágio da tuberculose pulmonar, sendo que oito apresentavam doença mínima e sete já se encontravam com doença avançada. A divisão dos subgrupos teve como base o número de bacilos ácido-álcool resistentes nas expectorações (poucos 2+ e numerosos 4+) e características de cavitações mínimas, observadas nas radiografias realizadas aos segmentos apicais e posteriores dos lobos direito e esquerdo, bem como o envolvimento avançado do parênquima pulmonar, com presença de broncopneumonia, indicativa de doença progressiva²⁵.

Foi obtido um consentimento informado de todos os indivíduos incluídos neste estudo e o protocolo utilizado foi aprovado pela comissão de ética local.

Antígenos

O derivado de proteína purificado (PPD), lote RT44 foi adquirido ao Statens Serum Institute, (Copenhaga, Dinamarca) e utilizado numa concentração final de 10 μ g/ml. Os

antigénios foram todos testados de modo a determinar a concentração óptima para o uso. O mitogénio fitohemaglutinina (PHA), (Difco, Detroit Michigan, USA) foi utilizado como controlo positivo na concentração final de 8 µg/ml (dados não mostrados). O antigénio não bacteriano estreptoquinase-estreptodornase (streptokinase-streptodornase; SK/SD, Varidase) (Wyeth Laboratories, Maidenhead, Berks, UK) foi utilizado em 250 U/ml.

Bactéria

O *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, foi gentilmente cedido por D. Smith, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK, tendo sido cultivado em meio 7H9 enriquecido com glicerol e OADC (Bacto, Difco). As culturas foram cultivadas a 37°C, num agitador orbital até atingirem a fase mid-log, sendo posteriormente aliquoteadas e congeladas a -70°C. Antes de ser utilizada, uma alíquota de bactéria foi descongelada e sonicada durante 10 segundos, de modo a evitar os agregados bacterianos. Foram efectuadas várias diluições seriadas da bactéria, tendo sido plaqueadas em placas de agar 7H11 (Difco, Detroit, Michigan, USA). As unidades formadoras de colónias de *M. tuberculosis*, foram contadas após 10 a 14 dias de incubação a 37°C com ar húmido. As colónias foram contadas e foi calculada posteriormente, a concentração das unidades formadoras de colónias. O *M. tuberculosis* viável (Mtb) foi utilizado num rácio de infecção de uma unidade formadora de colónias (UFC) por monócito. O *M. tuberculosis* H37Rv morto (kMtb) foi preparado por autoclavagem durante 10 minutos e utilizado na mesma concentração que o *M. tuberculosis* viável.

Teste de linfoproliferação

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) foram isoladas de sangue heparinizado, por gradiente de densidade, numa concentração de 1.1×10^6 células/ml. Os ensaios foram efectuados como descrito por Silveira *et al*²⁶. As células foram estimuladas durante 6 dias com PPD, *M. tuberculosis* vivo e morto e utilizando o PHA como controlo positivo. A radioactividade incorporada foi medida num contador de radiações LS 6500 (Beckman), sendo expressa em contagens por minuto (cpm). Os resultados das proliferações linfocitárias são expressos como a média em cpm dos testes em triplicado menos a média em cpm das células cultivadas sem antigénio (Δ cpm).

Produção de citocinas

A quantidade de IFN- γ ou IL-5 presente nos sobrenadantes das culturas foi analisada por testes comerciais de ELISA (Endogen, Woburn, MA, U.S.A.). Os sobrenadan-

tes foram colectados no dia 6, armazenados a -20°C e analisados posteriormente, de acordo com as instruções do fabricante. O tempo óptimo relativo à quantificação da produção de IFN- γ e IL-5 foi o dia 6 (dados não mostrados). O intervalo de detecção de IFN- γ , por ELISA, foi de 20 000 a 4 pg/ml e para a IL-5 foi de 500 a 2 pg/ml. Verificou-se a existência de quantidades mínimas de IFN- γ ou IL-5, nos sobrenadantes de culturas não estimuladas, quer das células de controlos, quer das de doentes com tuberculose (<12 pg/ml para o IFN- γ e <8 pg/ml para a IL-5). Foi incluído em cada duplicado da placa de ELISA, um sobrenadante controlo positivo, de modo a controlar a variação em cada placa e de placa para placa (dados não mostrados).

Marcação de citocinas intracelulares

A presença de IFN- γ e IL-4 intracelular foi analisada utilizando um kit comercial IS Ultra Cell-Fix Perm Kit (Immune Source, UK). As células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) isoladas foram ressuspensas em meio de crescimento para uma concentração final de 1×10^6 células/ml e 2 ml desta suspensão foram incubados com e sem antigénio em placas de cultura de 24 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) e incubadas a 37°C, na presença de 5% de CO₂. No dia 5, a secreção de citocinas foi bloqueada pela incubação com uma baixa concentração de brefeldina A a 3 mg/ml, durante 16 horas a 37°C. No dia 6 foram adicionados a cada tubo, 1×10^6 CMSP, 40 ml de tampão de marcação (azida de sódio 1% com BSA a 2% em PBS) e 10 ml do anticorpo monoclonal específico contra o marcador de superfície ou de controlo isotópico, e as células foram de seguida incubadas a 4°C durante 30 minutos, no escuro. As CMSP foram posteriormente lavadas duas vezes com tampão de marcação (200 ml/tubo) e fixadas com 100 ml de tampão de fixação (paraformaldeído a 4%) durante 20 minutos. As CMSP foram seguidamente lavadas duas vezes com 200 ml de tampão de lavagem/permeabilização. As CMSP foram então ressuspensas com 50 ml de tampão de lavagem/permeabilização e 5 ml de anticorpo monoclonal para citocinas intracelulares ou controlo intracelular isotópico (BD Biosciences, Pharmingen, CA, USA) durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. As CMSP foram posteriormente lavadas duas vezes com tampão de marcação e a análise foi efectuada utilizando um FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, U.S.A.). Os parâmetros foram estipulados de modo a quantificar os linfócitos viáveis por *forward scatter* e *side scatter* e foi efectuada a aquisição de 50,000 eventos para cada amostra. A fluorescência foi analisada através da marcação de todos os linfócitos e através da análise dos perfis de isotiocianato de

fluoresceína (fluorescein isothiocyanate - FITC), ficoeritrina (phycoerythrin - PE), proteína peridina clorofila (peridinin chlorophyll protein - PerCP) e alofocianina (allophycocyanin - APC). As CMSP foram posteriormente definidas como células viáveis e não viáveis, utilizando um marcador de DNA, no qual as células mortas retêm a 7-aminoactinomicina D (dados não mostrados), que permite efectuar uma determinação da viabilidade e posterior análise das células vivas.

Análise estatística

Os dados são apresentados utilizando os valores médios \pm desvio padrão dos duplicados das amostras e dos ensaios. Foi utilizado um método não-paramétrico, o teste de Mann-Whitney U, que não conclui sobre a distribuição subjacente e a normalidade dos dados e que foi usado para estabelecer significância estatística entre os grupos de dados. As correlações entre os conjuntos de dados foram calculadas através do teste de correlação de Spearman.

RESULTADOS

Proliferação linfocitária e produção de IFN- γ , nas populações em estudo, como resposta aos antígenos micobacterianos.

De modo a caracterizar as respostas induzidas pelo painel de antígenos, fomos avaliar a linfoproliferação e a produção de IFN- γ como resposta ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo e morto, nos indivíduos saudáveis ($n=30$) (Figura 1A e B), tendo os resultados sido comparados com os obtidos nos doentes com tuberculose ($n=30$) (Figura 1C e D). Tanto o PPD como o *M. tuberculosis* foram capazes de induzir uma grande produção de IFN- γ nos doadores saudáveis (Figura 1A). A produção de IFN- γ foi quantificada no dia 7; nessas culturas verificou-se um aumento na produção de IFN- γ , até ao dia 7 (dados não mostrados), devido parcialmente à acumulação das citocinas nos sobrenadantes das culturas. A produção de IFN- γ foi maior face ao PPD, seguido pelo *M. tuberculosis*, vivo e morto, com uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.001$) entre as respostas desencadeadas por cada preparação. Os doentes com tuberculose demonstraram um decréscimo significativo na proliferação (Fig. 1D) ($p=0.001$) e na produção de IFN- γ (Fig. 1C) ($p=0.001$) face ao *M. tuberculosis* vivo e morto ($p=0.020$; $p=0.010$), quando comparados com os indivíduos saudáveis. No entanto, foi evidente que alguns dos doentes com tuberculose produziram maiores quantidades de IFN- γ como resposta ao PPD e mais notavelmente como resposta ao *M. tuberculosis*. As células de doentes com tuberculose

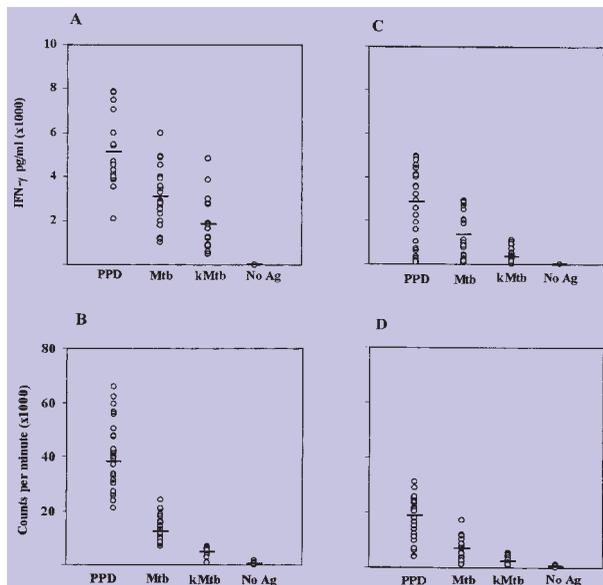


Fig. 1 - Produção de IFN- γ e respostas proliferativas das CMSP de doadores saudáveis ($n=30$) (A, B) e de doentes com tuberculose ($n=30$) (C, D).

As CMSP dos indivíduos saudáveis e dos doentes com tuberculose foram incubadas com PPD, *M. tuberculosis* vivo (*Mtb*) e morto (*kMtb*) ou incubadas sem estimulação (*No Ag*) durante 6 dias e foi quantificada a produção de IFN- γ (A, C) e a linfoproliferação (B, D). Os resultados de linfoproliferação são apresentados como a média das contagens por minuto (cpm) e o IFN- γ , quantificado pela técnica ELISA, é apresentado como o valor médio em pg/ml.

demonstraram uma diminuição significativa dos valores de proliferação e produção de IFN- γ em resposta ao PPD, comparativamente com os indivíduos saudáveis ($p=0.001$; $p=0.001$). Não se verificaram diferenças na produção de IFN- γ , nos doentes com tuberculose testados antes do início do tratamento ou após menos de uma semana do tratamento com as drogas (resultados não mostrados).

De modo a determinar se o decréscimo da proliferação linfocitária e na produção de IFN- γ , que se verificou nos doentes com tuberculose, era específico para os antígenos do *M. tuberculosis*, fomos analisar também as respostas ao mitogénio PHA e ao antígeno não micobacteriano estreptoquinase-estreptodornase (SK/SD). Os resultados demonstraram que os doentes com tuberculose conseguem desencadear uma resposta média (36000 ± 4431 cpm) de produção de IFN- γ positiva ao estímulo e ao controlo positivo, PHA. As respostas de IFN- γ ao antígeno estreptoquinase-estreptodornase (SK/SD) não foram significativamente diferentes, quando comparadas com os controlos ($p=0.218$).

Respostas das citocinas tipo 1 e tipo 2.

Nos indivíduos saudáveis ($n=30$) e nos doentes com

tuberculose (n=30) foram analisadas e comparadas as respostas tipo 1 (IFN- γ) e tipo 2 (IL-5) desencadeadas pelo painel de antígenos utilizados. A produção de IL-5 foi testada por técnicas de ELISA, devido às concentrações elevadas existentes nos sobrenadantes em estudo. As CMSP estimuladas dos doentes com tuberculose pulmonar (Quadro I) não mostraram diferenças estatísticas na produção de IL-5 ($p>0.050$), face a qualquer um dos antígenos, quando comparadas com o grupo controlo, apesar de se observar uma produção reduzida de IFN- γ , quando estimuladas com PPD e *M. tuberculosis* vivo. Sem estimulação antigénica, as culturas das CMSP dos doentes com tuberculose e do grupo controlo produziram quantidades de IL-5 <8 pg/ml. Este facto demonstrou que quando se agrupam os doentes apenas pela classificação clínica da doença tuberculosa pulmonar, não se verifica uma mudança de resposta tipo 1 para tipo 2, na infecção tuberculosa destes doentes, quando quantificados por técnicas de ELISA. No entanto, tornou-se evidente que nos doentes com tuberculose que produziram baixas concentrações de IFN- γ como resposta ao *M. tuberculosis*, se verificou um aumento na produção de IL-5 face ao bacilo vivo do *M. tuberculosis*.

Quadro I. Respostas de IL-5 em indivíduos saudáveis e em doentes com tuberculose pulmonar.

	Média IL-5 (pg/ml \pm DP)		
	PPD	Mtb	kMtb
Indivíduos saudáveis (n=30)	170 \pm 115	80 \pm 83	54 \pm 73
Doentes com tuberculose (n=30)	217 \pm 214	121 \pm 104	65 \pm 45

As CMSP foram estimuladas com PPD, *M. tuberculosis* vivo e morto durante 7 dias. Os valores de produção de IL-5 (pg/ml) para cada grupo encontram-se representados pela média \pm desvio padrão. A produção de IL-5 nas culturas não estimuladas foi sempre <8 pg/ml.

Heterogeneidade das respostas dos doentes com tuberculose.

Como mostrado na figura 1, verificou-se uma heterogeneidade considerável na capacidade das CMSP de diferentes indivíduos em secretar IFN- γ , como resposta aos antígenos utilizados. De modo a avaliar se a variabilidade

presente nas respostas dos doentes com tuberculose se correlacionavam com a gravidade da doença, os doentes com tuberculose foram posteriormente classificados como apresentando doença mínima ou avançada, de acordo com a caracterização da carga bacteriana. Não se observaram diferenças nas respostas dos doentes com tuberculose, que se pudessem correlacionar com a extensão (entre 0-7 dias) do tratamento anti-micobacteriano (dados não mostrados). O quadro II mostra as diferenças existentes dentro do grupo, de acordo com a gravidade da doença. Tornou-se evidente que os doentes com doença mínima podem induzir uma grande produção de IFN- γ face ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo ($p=0.020$; $p=0.001$), mas não como resposta ao *M. tuberculosis* morto ($p=0.099$), em comparação com os doentes que apresentavam doença num estágio avançado. Os doentes com doença tuberculosa mínima também demonstraram um aumento nas respostas proliferativas ao PPD ($p=0.030$) e ao *M. tuberculosis* vivo ($p=0.001$), em comparação com os doentes que apresentavam a doença em estágio avançado. Adicionalmente, agrupando os doentes com tuberculose tendo como base a gravidade da doença, os doentes com tuberculose avançada demonstraram um aumento significativo na produção de IL-5 como resposta ao PPD ($p=0.001$) e ao *M. tuberculosis* vivo (0.001), em comparação com os indivíduos saudáveis. Estas diferenças não se verificaram nos doentes com tuberculose mínima, nem como resposta ao PPD ($p=0.060$), nem como resposta ao *M. tuberculosis* vivo ($p=0.766$), em comparação com os indivíduos saudáveis.

Quadro II. Proliferação e produção de IFN-g e IL-5 induzida pelo PPD e pelo *M. tuberculosis* em 30 indivíduos saudáveis, 18 doentes com tuberculose com doença mínima e 12 doentes com tuberculose com doença avançada.

Estimulação	Média \pm DP			
	Métodos	Controlos	TB mínima	TB avançada
PPD	Pro (cpm)	38167 \pm 12527	23343 \pm 3267	11606 \pm 5947
	IFN- γ (pg/ml)	5128 \pm 1461	4052 \pm 747	1037 \pm 1022
	IL-5 (pg/ml)	170 \pm 115	89 \pm 66	414 \pm 216
Mtb	Pro (cpm)	12156 \pm 4509	9173 \pm 2491	3246 \pm 1291
	IFN- γ (pg/ml)	3070 \pm 1273	1995 \pm 843	348 \pm 247
	IL-5 (pg/ml)	80 \pm 83	67 \pm 59	204 \pm 104

As CMSP de indivíduos saudáveis (controlos) e de doentes com tuberculose (TB) com doença mínima e avançada, foram estimuladas com PPD e com *M. tuberculosis* vivo (Mtb) durante 6 dias. Os valores de proliferação (Pro), da produção (pg/ml) de IFN-g (IFN-g) e de IL-5 (IL-5), para cada grupo encontram-se representados pela média \pm desvio padrão (DP).

Produção intracelular de IFN- γ e IL-4 pelas células T induzidas pelo *M. tuberculosis*, nos indivíduos em estudo.

Foi utilizada a marcação intracelular de citocinas, para demonstrar a produção de citocinas dentro de cada um dos subtipos das células T. Após estimulação das CMSP com PPD e *M. tuberculosis*, os doadores saudáveis demonstraram a maior média positiva para IFN- γ , nas células T do fenótipo CD4+, enquanto que após a estimulação com *M. tuberculosis* vivo, as células T CD8+ responderam mais fortemente (Figura 2A). A marcação intracelular para o IFN- γ , no grupo total dos doentes com tuberculose (n=15) demonstrou uma frequência média mais baixa de células positivas para o PPD (CD4+, 10.51 ± 3.75 ; CD8+, 4.20 ± 1.55 ; $\gamma\delta$ TCR+, $.33 \pm .28$) e para o *M. tuberculosis*, (CD4+, 6.70 ± 1.76 ; CD8+, 9.76 ± 5.79 ; $\gamma\delta$ TCR+, 2.10 ± 1.50), quando comparados com os doadores saudáveis. A maior produção de IFN- γ , pelos indivíduos controlo, foi significativa ($p < 0.050$) para o PPD e para o *M. tuberculosis*, em todas as populações das células T. No entanto, os doentes com tuberculose com doença avançada (n=7) apresentaram um decréscimo significativo na positividade para IFN- γ , em todos os subtipos das células T ($p < 0.032$), para o PPD e *M. tuberculosis*, em comparação com os doentes com tuberculose apresentando doença mínima (n=8) (Figura 2A).

Os doentes com tuberculose (n=15) demonstraram um aumento médio de IL-4 intracelular, após as CMSP serem estimuladas com *M. tuberculosis* vivo (CD4+, 1.40 ± 1.57 ; CD8+, 5.48 ± 5.8 ; $\gamma\delta$ TCR+, 2.05 ± 2.11). Este facto foi mais marcante nas células T com o fenótipo CD8+, mas também se verificou nas células T CD4+ e $\gamma\delta$. Tal como observado para as respostas de IFN- γ , verificou-se uma variação na produção de IL-4 nos diferentes doentes (Figura 2B). Os doentes com tuberculose que demonstraram uma secreção elevada de IL-4, apresentavam uma forma avançada da doença. Os doentes com tuberculose com doença avançada demonstraram um aumento significativo de IL-4 intracelular, como resposta ao *M. tuberculosis* nas células CD4+ ($p=0.003$), CD8+ ($p=0.001$) e $\gamma\delta$ ($p=0.001$), em comparação com os doentes com tuberculose com a forma mínima da doença. Nos doentes com tuberculose, o aumento da produção de IL-4 pelas células T CD8+ e $\gamma\delta$, após estimulação com *M. tuberculosis* vivo, encontra-se correlacionado com a gravidade da doença ($R=0.585$; $R=0.866$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, a magnitude da produção de IFN- γ e de IL-4/IL-5, que se verifica após a estimulação com PPD e *M.*

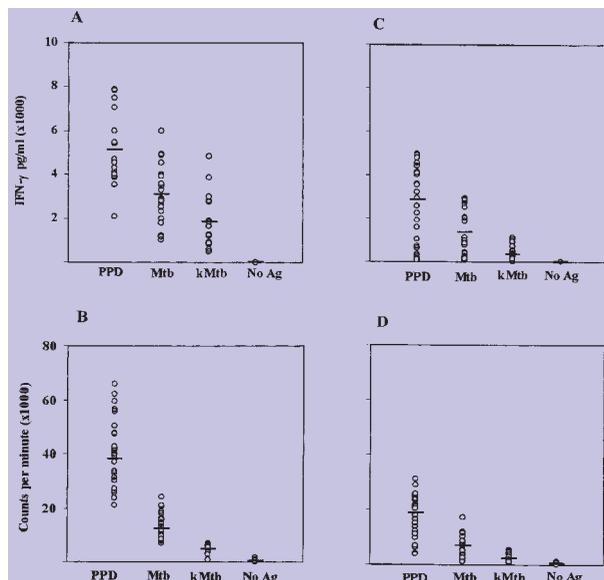


Fig. 2 - Produção intracelular de IFN-g e de IL-4 pelos subtipos de células T dos indivíduos em estudo.

As CMSP dos doadores saudáveis (n=15), dos doentes com tuberculose com doença mínima (n=8) (Min TB) e com doença avançada (n=7) (Adv TB) foram estimuladas durante 6 dias com PPD, *M. tuberculosis* vivo e incubadas sem antígeno. Foram marcadas aliquotas de cada população, para a expressão dos marcadores de superfície das células T CD4, CD8 e $\gamma\delta$ em combinação com o IFN-g (A) e a IL-4 (B) intracelulares. Os resultados são expressos como % positivas para IFN-g ou IL-4 intracelulares, e para a proporção de células T CD4+, CD8+ ou $\gamma\delta$ TCR+ que apresentam marcação positiva para as citocinas. As células não estimuladas originaram uma baixa marcação para IFN-g e IL-4 com valores positivos < 0.027 % para as duas citocinas intracelulares.

tuberculosis vivo, foi quantificada em controlos e em doentes com tuberculose, através de duas técnicas, ELISA e citometria de fluxo. A relação entre a susceptibilidade de cada indivíduo à tuberculose e a sua resposta imunitária ainda não se encontra bem definida, o que denota a importância de definir a resposta imunitária protectora, dentro da população em estudo. Após a infecção com *M. tuberculosis*, cerca de 5% dos indivíduos desenvolvem tuberculose progressiva e alguns indivíduos apresentam 5% de reactivação retardada dentro dos primeiros dois anos; o que pode prever que a heterogeneidade da resposta imune pode contribuir para estas diferenças. A análise da capacidade dos doentes com tuberculose pulmonar em responder ao *M. tuberculosis* virulento, pode também elucidar factores que se encontrem envolvidos na imunossupressão que ocorre nesta doença.

Os resultados deste estudo demonstraram que as respostas do IFN- γ , detectadas por ELISA, no grupo dos indivíduos saudáveis, foram estatisticamente maiores face

ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo, do que no grupo dos doentes com tuberculose. A capacidade reduzida dos doentes com tuberculose em produzir IFN- γ como resposta ao PPD e ao *M. tuberculosis* vem alicerçar os resultados obtidos em outros estudos^{27,13}, incluindo um estudo no qual a produção de IFN- γ pelas CMSP estimuladas com *M. tuberculosis* H37Rv ou com as estirpes Erdman, se encontrava reduzida comparativamente com indivíduos saudáveis vacinados com o BCG¹¹. A incapacidade de indivíduos com tuberculose activa para produzirem IFN- γ adequadamente, como resposta ao PPD e ao *M. tuberculosis*, pode dever-se a uma regulação deficiente da apresentação antigénica pelos macrófagos e à activação de mediadores de supressão. Por exemplo, tem sido sugerido que em doentes com tuberculose, um excesso na produção de TGF- β pode contribuir para a redução da expressão do receptor da IL-12, o que resulta numa produção de IFN- γ reduzida²⁷. Nestes estudos, a imunossupressão que se encontra presente nestes doentes, pode também ser devida ao sequestro de células T específicas de antigénio, localizadas no local da infecção pulmonar. Apesar destas explicações poderem contribuir para algumas das respostas reduzidas, os dados aqui apresentados sugerem que a modulação pela IL-4, também pode ter um papel importante na redução das respostas que envolvem as citocinas tipo 1. Alguns estudos têm documentado um aumento na produção de IFN- γ após um tratamento anti-tuberculose²⁸⁻³⁰; no nosso caso o período do tratamento que alguns dos doentes receberam foi muito curto para causar qualquer tipo de modulação da resposta imune e não foi possível avaliar novamente os doentes, após estes terem concluído a terapia.

O grupo de doentes com tuberculose, foi subdividido em doentes com formas mínimas ou avançadas da doença, tendo como base as características observadas nas radiografias e a carga de bacilos ácido-álcool resistentes existentes nas expectorações dos mesmos. As respostas de IFN- γ foram consistentemente mais baixas nos doentes com formas avançadas da doença. Um estudo efectuado na Argentina, com doentes com tuberculose, também verificou uma redução na produção de IFN- γ induzida por *M. tuberculosis* sonicado, à medida que a gravidade da doença foi aumentando de mínima para avançada²⁷. Outros estudos^{31,32} demonstraram que apesar da produção de IFN- γ ser reduzida na tuberculose, são as quantidades aumentadas de citocinas tipo 2, como por exemplo a IL-4, que se correlacionam com a gravidade desta doença. Este facto indica que a presença de citocinas tipo 2 na infecção tuberculosa pode encontrar-se associada com a imunopatologia dos pulmões.

Os doentes com tuberculose pulmonar não demonstraram nenhuma diferença na produção de IL-5, quando quantificada por ELISA e comparando com os controlos. Estudos efectuados anteriormente demonstraram que nos doentes com tuberculose, a depressão da expressão de citocinas tipo 1, não se encontra associada com o aumento da produção de IL-4 e IL-10 (tipo 2), sendo que o mesmo se verificou nos controlos^{6,13}. No entanto, existem outros registos de que a produção de IL-4 é mais frequente em doentes com tuberculose do que em controlos^{7,14,31}, o que suporta os resultados aqui apresentados. Os doentes com tuberculose com envolvimento avançado do parênquima pulmonar, que apresentam broncopneumonia, indicativo de doença progressiva, constituíram o grupo de indivíduos com uma resposta aumentada de IL-4 ao *M. tuberculosis*. Este resultado encontra-se de acordo com o estudo de Seah *et al*³², no qual se demonstrou que os doentes com tuberculose apresentando uma doença mais extensa, como confirmado por radiografia, demonstraram um aumento do número de cópias de RNAm de IL-4, mas não de RNAm de IL-13, quando comparados com dadores saudáveis tuberculina positivos em contacto próximo com doentes com tuberculose. Estudos recentes efectuados por Seah *et al*³² demonstraram que níveis elevados de IL-4 se correlacionam com a gravidade da doença e com níveis de IgE e de CD30 solúvel, no soro. Experiências analisando a imunohistoquímica e a hibridação *in situ*¹⁵ para detectar as citocinas presentes nos granulomas pulmonares dos doentes com tuberculose, demonstraram que quatro dos sete doentes analisados, demonstraram granulomas marcados positivamente para IL-4 e que foram sempre positivos para IFN- γ . Este estudo também demonstrou que todos os granulomas necróticos foram positivos para TNF- α , sendo esta associação modulada pela IL-4. Adicionalmente, os rácios de cortisol/cortisona³³ demonstraram-se aumentados no fluido da lavagem bronco-alveolar dos doentes com tuberculose, comparado com os controlos. Estes resultados sugerem que na tuberculose pulmonar progressiva, em particular nos pulmões, se verifica um aumento na conversão da cortisona em cortisol, nas lesões tuberculosas. Evidências correntes sugerem^{34,35} que durante a infecção tuberculosa, dentro do pulmão, se verifica uma resposta imune de citocinas tipo 1, localmente aumentada pela actividade da reductase e pelo recrutamento de cortisona, conduzindo deste modo a um aumento nas concentrações de cortisol. A presença de concentrações elevadas de cortisol nos pulmões, resulta num aumento do *feedback* mediado pelo cortisol, no processo inflamatório, conduzindo deste modo a uma expressão da resposta tipo 2.

Os resultados de IFN- γ intracelular obtidos por citometria de fluxo e aqui apresentados, confirmam que doadores saudáveis vacinados com o BCG demonstram um aumento de IFN- γ intracelular, após estimulação das células T CD4+ com PPD, enquanto que se a estimulação for efectuada com *M. tuberculosis* vivo, esse aumento é visível nas células T CD8+ e numa menor extensão nas células T $\gamma\delta$. Cerca de 40% das células T CD4+ presentes em cultura durante sete dias, após estimulação com PPD, expressaram IFN- γ , indicando a proliferação extensiva de células T específicas de antígeno, nessas mesmas culturas. Quando se avaliou a produção de IFN- γ e IL-4 pelas CMSP dos doentes com tuberculose, a produção de IFN- γ foi reduzida, enquanto que se verificou um aumento da produção de IL-4, particularmente pelas células T CD8+. Foi efectuado um estudo, no qual se demonstrou que após a estimulação das CMSP, de doentes com tuberculose, com *M. tuberculosis* vivo, se verifica um decréscimo na produção de IFN- γ e que não se verifica um aumento na produção de IL-4, nem sistemicamente, nem no local da doença, quando comparados com doadores saudáveis reactivos à tuberculina⁶. Um estudo mais recente demonstrou que quando as CMSP de doentes da Gâmbia, com tuberculose, são estimuladas com *M. tuberculosis*, as células T CD8+ apresentaram um aumento na produção de IL-4⁹; no entanto, esta observação foi efectuada num grupo muito reduzido de doentes com tuberculose, que viviam num ambiente onde são frequentes as infecções intestinais por helmintes. Os resultados aqui apresentados mostram que a produção de IL-4 pode ser detectada nas células T CD4+, CD8+ e $\gamma\delta$ e que a sua produção pode ocorrer quer em doentes com tuberculose que vivam em países tropicais, onde as infecções por helmintes sejam frequentes, quer em doentes com tuberculose que vivam em determinadas zonas da Europa.

CONCLUSÃO

Concluindo, este estudo demonstrou que os doadores saudáveis vacinados com o BCG apresentam respostas elevadas de IFN- γ , como detectado pelas técnicas de ELISA e de citometria de fluxo, ao PPD e ao *M. tuberculosis* vivo em comparação com os doentes com tuberculose. Os doentes com tuberculose pulmonar demonstraram uma redução significativa na capacidade de produzir IFN- γ , como resposta ao PPD e ao *M. tuberculosis*. O grupo total dos doentes com tuberculose não demonstrou diferenças significativas na produção de IL-5, em resposta aos antígenos utilizados, quando se utilizaram as técnicas de ELISA. No entanto, utilizando a técnica de citometria de fluxo, a produção de IL-4 intracelular encontra-se aumen-

tada nos doentes com tuberculose, com forma avançada da doença e em maior frequência nas células T CD8+ e $\gamma\delta$. Assim, apesar de se poder verificar uma redução na produção de citocinas tipo 1, na ausência de uma mudança total para a activação de tipo 2, existem evidências de activação de células específicas de antígeno e produtoras de citocinas tipo 2, particularmente na tuberculose avançada, se forem utilizados métodos de detecção de sensibilidade elevada. Esta activação tipo 2 das células T CD8+ e $\gamma\delta$ pode ser um efeito secundário do processo inflamatório, que contribui para a imunopatologia que se encontra presente na doença tuberculosa.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a D. Smith, da London School of Hygiene & Tropical Medicine, UK, por ter gentilmente cedido a estirpe de *M. tuberculosis* H37Rv. Gostaríamos também de agradecer aos seguintes departamentos por terem cedido gentilmente as amostras dos doadores, nomeadamente: a Kamal Mansinho, Carlos Araújo, Jaime Nina e Fernando Borges do Serviço de Infecçiology e de Medicina Tropical e P. Abecassis, José Pimenta da Graça, Sílvia Sousa e Maria Francisca Moraes, do Serviço de Medicina II e A. Fernandes e Ramiro Goulart Ávila, Maria João Ávila e Berta Mendes do Serviço de Pneumologia IV, Pulido Valente Hospital, Lisboa; Ana Barbado e Natália André do Hospital Dr. José Maria Antunes Júnior, Barro, Torres Vedras. Gostaríamos de agradecer à nossa instituição promotora, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais (CMDT/IHMT) por providenciar apoio administrativo; ao Departamento de Microbiologia do IHMT por providenciar apoio logístico laboratorial e a J. Atouguia do Departamento de Clínica de Doenças Tropicais por providenciar um gabinete de trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. BOAVENTURA JL: Os números da tuberculose: aspectos epidemiológicos actuais. Inform SIDA e Outr Doen Infecç 1999; 16:28-9.
2. RAVIGLIONE MC, RIEDER HL, STYBLO K, KHOMENKO AG, ESTEVES K, KOCHI A: Tuberculosis trends in Eastern Europe and the former USSR. Tuberc Lung Dis 1994; 75:400-16.
3. RAVIGLIONE MC, SUDRE P, RIEDER HL, SPINACI S, KOCHI A: Secular trends of tuberculosis in Western Europe. Bull WHO 1993; 71:297-306.
4. RIEDER HL, ZELLWEGER JP, RAVIGLIONE MC, KEIZER ST, MIGLIORI GB: Tuberculosis control in Europe and international migration. Eur Respir J 1994; 7:1545-53.
5. MOSMANN TR, SAD S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996; 17:138-46.
6. LIN Y, ZHANG MF, HOFMAN FM, GONG J, BARNES PF: Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. Infect Immun 1996; 64:1351-56.

7. SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S *et al*: Th1 / Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunol* 1994; 81:171-76.
8. BHATTACHARYYA S, SINGLA R, DEY AB, PRASAD HK: Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis *Infect Immun* 1999; 67:5597-5603.
9. SMITH SM, DOCKRELL HM: Role of CD8+ T cells in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 2000; 78:325-33.
10. DAS G, VORHA B, SAHA B, AGREWALA JN, MISHRA GC: Apoptosis of Th1-like cells in experimental tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 1999; 115:324-28.
11. JOHNSON BJ, MCMURRAY DN: Cytokine gene expression by culture of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect Immun* 1994; 62:1444-50.
12. SANCHEZ FO, RODRIGUEZ JI, AGUDELO G, GARCIA LF: Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun* 1994; 62:5673-78.
13. ZHANG M, GONG J, PRESKY DH, XUE W, BARNES PF: Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol* 1999; 162:2441-47.
14. VAN CREVEL R, KARYADI E, PREYERS F, *et al*: Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 2000; 181:1194-97.
15. FENHALLS G, STEVENS L, BEZUIDENHOUT J, *et al*: Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculosis granulomas. *Immunol* 2002; 105:325-35.
16. COOPER AM, DALTON DK, STEWART TA, GRIFFIN JP, RUSSELL DG, ORME IM: Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178:2243-47.
17. FLYNN JL, CHAN J, TRIEBOLD KJ, DALTON SK, STEWART TA, BLOOM BR: An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178:2249-54.
18. KAMIJO R, LE J, SHAPIRO D *et al*: Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 178:1435-40.
19. KUMARARATNE DS: Tuberculosis and immunodeficiency-of mice and men. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:11-14.
20. International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study. A controlled trial of interferon gamma to prevent infections in Chronic Granulomatous Disease. *New Engl J Med* 1991; 324:509-16.
21. HO JL, 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. *J Infect Dis* 1992; 165:344-51.
22. TURNER J, DOCKRELL HM: Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells *in vitro*. *Immunol* 1996; 87:339-342.
23. SMITH SM, MALIN AS, PAULINE T *et al*: Characterization of human *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin-reactive CD8+ T cells. *Infect Immun* 1999; 67:5223-30.
24. MARTINEZ OM, GIBBONS RS, GAROVOY MR, ARONSON FR: IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2 dependant proliferation of human T cells. *J Immunol* 1990; 144:2211-15.
25. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-95.
26. SILVEIRA HD, 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; 110:26-34.
27. DLUGOVITSKY D, BAY ML, RATENI L *et al*: *In vitro* synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-a beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with severity of pulmonary involvement. *Scand J Immunol* 1999; 49:210-17.
28. BARNES PF, MODLIN RL: Human cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Micro Immunol* 1996; 215:197-219.
29. TURNER J, CORRAH T, SABBALLY S, WHITTLE H, DOCKRELL HM: A longitudinal study of *in vitro* IFN gamma production and cytotoxic T cell responses of tuberculosis patients in the gambia. *Tuber Lung Dis* 2000; 80:161-9.
30. ELLNER JJ, HIRSCH CS, WHALEN CC: Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Infect Dis* 2000; S3:S279-82.
31. SEAH GT, SCOTT GM, ROOK GAW: Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 181:385-89.
32. SEAH GT, ROOK GA: High levels of mRNA encoding IL-4 in unstimulated peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients revealed by quantitative nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction; correlations with serum IgE levels. *Scand J Infect Dis* 2001; 33:106-9.
33. BAKER RW, WALKER BR, SHAW RJ *et al*: Increased cortisol:cortisone ratio in acute pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1641-7.
34. ROOK G, BAKER R, WALKER B *et al*: Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:913-22.
35. ROOK GA, SEAH G, USTIANOWSKI A: *M. tuberculosis*: immunology and vaccination. *Eur Respir J* 2001; 17:573-57.