

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

PRÉMIO THOMÉ VILLAR/BOEHRINGER INGELHEIM, 1997  
THOMÉ VILLAR/BOEHRINGER INGELHEIM AWARD, 1997

# Influência dos perfis Th1/Th2 no espectro de gravidade da Tuberculose Pulmonar\*

## Influence of Th1/Th2 profiles in the spectrum of severity of Pulmonary Tuberculosis

BAGANHA MF<sup>1</sup>, TAVARES MARQUES MA<sup>2</sup>, MOTA PINTO A<sup>3</sup>, VERA L<sup>4</sup>, MESQUITA L<sup>5</sup>,  
ROBALO CORDEIRO C<sup>6</sup>, ALCOBIA C<sup>2</sup>, BOTELHO MF<sup>7</sup>, SANTOS ROSA MA<sup>8</sup>

### RESUMO

No contexto epidemiológico da tuberculose (TB) que presentemente assola o nosso país destaca-se o número progressivamente crescente de formas clínicas graves e que atingem indivíduos aparentemente imunocompetentes.

### ABSTRACT

Under the present epidemiologic conditions of Pulmonary Tuberculosis (PT) of our country, with increasing incidence of clinical severe forms of disease in immunocompetent individuals, we tried to identify some relevant phenomena occurring in deep

<sup>1</sup> Professor Associado/Agregado da FMC. Chefe de Serviço de Pneumologia dos HUC

<sup>2</sup> Assistente Hospitalar de Pneumologia

<sup>3</sup> Professora Auxiliar da FMC. Directora do Instituto de Patologia Geral da FMC

<sup>4</sup> Assistente da FMC

<sup>5</sup> Técnico Superior da FMC

<sup>6</sup> Professor Auxiliar da FMC. Assistente Hospitalar de Pneumologia

<sup>7</sup> Professora Associada da FMC

<sup>8</sup> Professor Associado da FMC. Director do Centro de Imunologia da FMC

\* Trabalho de Investigação subsidiado pelo Projecto 57/95 da Comissão de Fomento da Investigação do Ministério da Saúde, do qual foi Coordenadora a Dr<sup>a</sup> Maria Alcide Tavares Marques

Recebido/Acete para publicação: 98.11.13

Na tentativa de contribuir para o esclarecimento dos fenómenos que na intimidade do pulmão profundo comandam as perturbações patogénicas que ocorrem nestas situações, estudámos 35 doentes portadores de tuberculose pulmonar (TP), todos VIH negativos e sem toxicod dependência, divididos, logo na fase inicial, por dois Grupos (I e II) em função da expressão clínica da sua afecção:

- Grupo I, constituído por 15 doentes que exibam formas limitadas e clinicamente menos graves, 13 do sexo masculino e 2 do feminino, com uma média de idades de  $45.6 \pm 18.2$  anos.
- Grupos II, formado por 20 pacientes atingidos por formas graves, com lesões muito extensas, por vezes com bacilos resistentes, 14 homens e 6 mulheres, com uma média de idades de  $32.8 \pm 4.8$  anos.

A metodologia utilizada dirigiu-se à avaliação da imunidade celular e humoral, tanto no pulmão profundo (LLBA), como no sangue periférico, através dos seguintes parâmetros:

- Celularidade total e percentual do LLBA, com recurso à câmara de Neubauer e leitura por microscopia óptica.
- Contagem das populações e subpopulações linfocitárias CD3, CD19, CD4, CD8,  $\gamma/\delta$ , CD16 CD56, CD4+ CD7+ (Th1), CD4+CD7- (Th2), com anticorpos monoclonais e leitura por citometria de fluxo.
- Determinação dos níveis intra-celulares das citocinas  $\gamma$ -INF e IL-4, por citometria de fluxo.
- Doseamento sanguíneo das Igs A, G e M, das fracções C3 e C4 do Complemento e da  $\alpha$ -1-antitripsina, por nefelometria.
- Avaliação da auto-florescência dos macrófagos alveolares, com contagens acima dos 10, 100 e 1000 canais, por citometria de fluxo.
- Análise estatística dos resultados através da variância, test t-student, médias e desvios padrões e correlação linear.

Dos resultados obtidos salienta-se:

- Presença de uma moderada alveolite, de predomínio macrófágico, no Grupo I, e linfocitário, acompanhado de um ligeiro aumento do número de polimorfonucleares neutrófilos, no Grupo II.
- No pulmão profundo, as células T e a subpopulação CD4 encontravam-se ligeiramente mais elevadas nas formas mais graves, enquanto que as subpopulações  $\gamma/\delta$  e NK diminuíam com a gravidade da afecção.
- Predomínio do fenótipo Th1 e de  $\gamma$ -INF nas

lung, associated with the pathogenic abnormalities seen in these situations.

We studied 35 patients with PT, all HIV seronegative, without prior history of drug addiction, divided in two Groups (I and II) concerning the clinical severity and the radiological extent of infection.

Group I, 15 patients with limited forms of PT, 13 males and 2 females, aged  $45.6 \pm 18.2$  years.

Group II, 20 patients, with severe forms of PT, some with multidrug resistance bacillus, 14 males and 6 females aged  $32.8 \pm 4.8$  years.

The methodology was directed towards the evaluation of cellular and humoral immunity, both, in deep lung through (BALF) as in peripheral blood, by the following parameters:

- Total and percentual cellularity of BALF by the Neubauer chamber and optic microscopy.
- Lymphocytic populations and subsets: CD3, CD19, CD4, CD8,  $\gamma/\delta$ , CD16 CD56, CD4+ CD7+ (Th1), CD4+CD7- (Th2), with monoclonal antibodies and flow cytometry.
- Evaluation of intracellular levels of cytokines:  $\gamma$ -INF and IL-4 by flow cytometry.
- Serum levels of IgA, IgG and IgM, C3 and C4 complement fractions and  $\alpha$ -1 Pi-inhibitor by nefelometry.
- Determination of alveolar macrophage auto-fluorescence, with counts above 10, 100 and 1000 channels by flow cytometry.
- Statistical analysis of the results through student t test, variant analysis and linear correlation.

From the results:

- Moderate macrophage and lymphocytic alveolitis in Group I associated with slight increase of the number of polimorfonuclear neutrophils in Group II.
- In the deep lung, the T cells and the CD4 subset are slightly increased in the severe forms, while the  $\gamma/\delta$  and NK subpopulations decrease with the severity of the infection.
- Predominance of Th1 phenotype and  $\gamma$ -INF in the affected areas in the limited forms, and Th2 and IL-4 in the severe forms.
- In peripheral blood, the Th1 cells as well as  $\gamma$ -INF, reaches always higher levels than Th2 or IL-4, independent of the severity of the situation.
- The alveolar macrophage auto-fluorescence decreases significantly mainly in the counts above 100 channels, parallel to the importance of the lesions.

áreas lesadas das formas clinicamente mais moderadas e de Th2 e IL-4 nas mais graves.

- No sangue periférico, os Th1 e a citocina  $\gamma$ -INF encontravam-se sempre em níveis mais elevados do que os Th2 e a IL-4, independentemente da gravidade da situação.
- A auto-fluorescência dos macrófagos alveolares diminuía muito significativamente, de uma forma paralela à importância das lesões.
- As variações, sempre muito diminutas, da imunidade humoral, não se mostraram relevantes no contexto de gravidade da TB.
- O fenómeno da resistência medicamentosa, abordado separadamente, não condicionou desvios dos parâmetros analisados, quando comparado com os restantes indivíduos que integravam o Grupo II.

Estes resultados sugerem as seguintes conclusões:

- A gravidade clínica da TP espalha-se ao longo de um espectro limitado por dois polos: um, caracterizado por um perfil Th1, com capacidade de promover a estimulação da actividade microbicida do macrófago alveolar e que, por isso, confere resistência orgânica a esta infecção; outro, no qual predomina o perfil Th2, que por inibir funcionalmente o macrófago alveolar torna o organismo mais susceptível a esta agressão micobacteriana.
- Assim, aquilo que sob o ponto de vista imunitário mais caracteriza a gravidade da TP é a elevação da percentagem de linfócitos Th2 e das respectivas citocinas nas áreas lesadas.
- As variações dos perfis Th1/Th2 ocorrem fundamentalmente no pulmão profundo, já que, no sangue periférico, o perfil Th1 predominava sempre sobre o Th2, independentemente da gravidade da situação clínica.
- Este facto sugere que a avaliação da capacidade de resposta imunitária à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* deverá ser efectuada localmente, através da LBA, pois é no pulmão profundo que as células Th (Th0?) se diferenciam em Th1 ou Th2, influenciadas pelo microambiente citocínico presente nessas áreas.
- Estes achados permitem-nos acalentar fundamentadas esperanças na terapêutica imunomoduladora, em situações clinicamente graves que não respondem satisfatoriamente à medicação antibiótica correctamente instituída.

- The variations of the serum levels of immunoglobulins are insignificant, so the humoral variations aren't relevant in the context of severity of PT.
- The drug resistance phenomenon, was separately analysed and didn't influence the results when comparing the remaining individuals of Group II.

These results may suggest the following conclusions:

- The clinical severity of PT, is part of a spectrum limited by two poles - one characterized by the Th1 profile, with capacity to promote the stimulation of microbicidal activity of the alveolar macrophage, then conferring organic resistance to this infection; the other, in which Th2 profile prevails, inhibits the function of the alveolar macrophages, bringing the host more susceptible to this mycobacterial aggression.
- The principal mark of the severity of PT, is the increased percentage of Th2 cells as well as the concerning cytokines in the affected areas.
- The variations of the Th1/Th2 profiles occur mainly in deep lung, once in the peripheral blood the Th1 profile always prevails, independent of the severity of the clinical situation.
- This may suggest that the evaluation of the immune capacity against *Mycobacterium tuberculosis* infection must be done at the local level by bronchoalveolar lavage, once the deep lung is certainly the place for differentiation of Th (Th0?) cells into Th1 or Th2, under the influence of the cytokine microenvironment of these areas.
- These findings, allowed us to expect that immunomodulation therapeutics may be successful in severe clinical situations not responding to a correct antibiotic therapy.
- The compartment of these immune abnormalities at the lung level suggest the interest of the inhalatory way in such therapeutic approaches.

REV PORT PNEUMOL 1998; IV (6): 535-580

**Key-words:** Tuberculosis; Spectrum of Severity of Pulmonary Tuberculosis; Lymphocytic and Cytokine Spectrum of Pulmonary Tuberculosis; Th1/Th2 Profile in Pulmonary Tuberculosis; Auto - fluorescence of Alveolar Macrophage; Immunomodulation in Pulmonary Tuberculosis

- A compartimentação destas perturbações imunitárias a nível do pulmão profundo aponta para o provável interesse na utilização da via inalatória para este tipo de intervenção terapêutica.

REV PORT PNEUMOL 1998; IV (6): 535-580

**Palavras-chave:** Tuberculose; Espectro de gravidade da tuberculose pulmonar; Espectro linfocitário e citocínico da tuberculose pulmonar; Perfis Th1/Th2 na tuberculose pulmonar; Auto-fluorescência do macrófago alveolar; Imunomodulação da tuberculose pulmonar

"Aquilo que mais caracteriza a tuberculose é a sua patogenia (respostas imunes por células contra o *Mycobacterium tuberculosis*)"

TSUYUGUCHI I  
*Kekkaka* 1995; 70: 335-346

## INTRODUÇÃO

Desde que na década de quarenta se iniciou o tratamento específico da tuberculose (TB), viria a assistir-se a um contínuo declínio da incidência, da prevalência e da mortalidade desta afecção, particularmente no período que se seguiu à última Grande Guerra e que se prolongou até meados dos anos oitenta, sobretudo nos países ocidentais.

Entretanto, dever-se-á reconhecer que se a aplicação de tratamentos progressivamente mais eficazes contribuiu larga e decisivamente para esta evolução, outros factores foram igualmente importantes neste contexto, como a melhoria das condições de vida das populações, os progressos técnico-científicos que conduziram a uma mais apurada identificação do *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e dos mecanismos da sua transmissão e, ainda, a difusão da vacinação pelo bacilo de Calmette e Guérin (BCG).

No entanto, após um curto período de estabilização, a gravidade da TB encontra-se hoje, de novo, em nítida e preocupante ascensão. De facto, calcula-se que, já em

1990, cerca de um terço da população mundial se encontrava infectada pelo MT, o que contribuiu para que surjam anualmente 8 a 10 milhões de novos casos (perto de 16 milhões se fossem contabilizadas as formas pulmonares não contagiantes e as situações de localização extratorácica) e cerca de 3 milhões de óbitos, o que representa 7% das causas de morte em geral e 18.5% das que ocorrem entre os quinze e os trinta anos de idade.

As importantes consequências sociais e económicas que esta situação acarreta afectam particularmente os países do terceiro mundo, aos quais se circunscrevem 95% da morbilidade e 98% da mortalidade adstritas a esta afecção. E como parecem já tão longínquos os tempos em que se perspectivava a sua erradicação nos países nórdicos por volta do ano 2020. Por isso, somos obrigados a reconhecer que a extinção da TB nunca passou de uma miragem, dado que ela voltou a assumir características dramaticamente graves e a constituir a primeira causa de morte na dependência de um agente infeccioso único.

Esta tendência evolutiva, a par do reconhecimento

de microepidemias hospitalares, da detecção de um número crescente de formas bacilares multirresistentes e da sua crescente associação à infecção pelo VIH, tem desencadeado uma importante intervenção da classe médica e um justificado alarmismo entre as populações.

Os primeiros sinais desta inquietação vieram dos Estados Unidos da América (1), quando foram publicados os dados epidemiológicos relativos a 1986, os quais permitiram reconhecer uma inversão na curva de incidência, que vinha diminuindo, em valores médios, 6.7% por ano desde 1953 (28.500 novos casos em 1978 e 22 000 em 1984) (2). Este retrocesso epidemiológico afectou igualmente a região europeia, onde se reconhecem idênticos fenómenos evolutivos. Com efeito, a incidência da TB, que tinha caído para metade entre 1974 e 1991, voltou a crescer desde essa data, acompanhada pelo aumento da mortalidade, particularmente nos grupos etários situados para além dos sessenta e cinco anos de idade (3,4,5). E se é certo que este panorama não pode ser generalizado à totalidade dos países da Europa Ocidental, a verdade é que, presentemente, apenas num diminuto número deles parece existir uma tendência à sua regressão (4).

Em Portugal, a situação é manifestamente preocupante. Na verdade, a incidência da TB, que entre nós se esbateu continuamente até 1980, é quase uniforme desde 1990, com índices anuais muito semelhantes e que ultrapassam o triplo da média europeia, o mesmo se verificando em relação à mortalidade, arrastando-nos para a cauda do conjunto de países que conosco integram a União Europeia (6).

O incómodo lugar em que nestes domínios nos encontramos situados face aos restantes países ocidentais, decorre, como habitualmente acontece nestas circunstâncias, da aplicação de um Programa de Luta Anti-Tuberculosa desajustado das actuais realidades que envolvem esta afecção, inequivocamente atestado por alguns parâmetros epidemiológicos: inaceitáveis taxas de incidência, prevalência, mortalidade e de formas clínicas particularmente graves; ausência de diagnóstico precoce; diminutos índices de identifica-

ção bacteriológica; elevado número de recidivas, assim como de insucessos e de abandonos terapêuticos, etc. (6).

Quais as causas deste retrocesso ofensivo, nalguns casos acelerado, que vem ocorrendo por todo o mundo desde há cerca de uma década?

Para a maioria dos autores, nos últimos anos, alguns factores têm vindo a envolver-se e a serem apontados como decisivos nesta indesejável e perigosa evolução da TB:

- Crescente expansão demográfica.
- Elevados índices de pobreza nalgumas regiões do globo.
- Importação de mão de obra de países onde a TB atinge taxas de prevalência notoriamente graves.
- Reagrupamento de populações por motivos de natureza política, religiosa e/ou económica.
- Progressivo aumento da idade média de vida de algumas populações e conseqüente envelhecimento imunitário em indivíduos infectados pelo MT.
- Explosão da infecção pelo VIH.

Ora, dado que as repercussões da infecção tuberculosa resultarão sempre do desfecho final da luta que se estabelece entre as defesas orgânicas do hospedeiro, eventualmente coadjuvadas por agentes terapêuticos, e a capacidade agressora do MT, de que dependerá esta nova face epidemiológica da TB? De uma maior agressividade do MT ou de uma diminuição das potencialidades defensivas do organismo?

Sabendo-se que a resistência orgânica a esta agressão assenta, preponderantemente, nas respostas imunes medidas por células, em particular pelo macrófago e pelo linfócito T, os quais constituem a principal linha de defesa, e por isso comandam os mecanismos patogénicos envolvidos nesta afecção, será que o número crescente de situações graves em indivíduos aparentemente imunocompetentes resulta de uma depressão imunitária local com participação dos factores acima apontados, susceptível de condicionar o espectro patogénico desta doença, do qual a co-infecção TB/SIDA parece representar a sua mais exuberante e reconhecida expressão?

**OBJECTIVOS**

Como ainda recentemente lembrava ROOK (7), *a imunopatologia necrosante que é acompanhada por uma diminuta capacidade microbicida representará, provavelmente, a chave que nos conduzirá à compressão da patogenia da tuberculose.*

É neste âmbito, e numa tentativa de contribuir para o esclarecimento dos fenómenos que comandam a evolução da TB na intimidade do pulmão profundo e, igualmente, de detectar eventuais diferenças de reacção que justifiquem o actual surto de formas pulmonares graves em indivíduos VIH negativos, que temos vindo a estudar estes aspectos, tanto no líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA), como no sangue periférico (SP), de um conjunto de doentes portadores de TP.

**MATERIAL E MÉTODOS****a – Material**

Neste contexto tivemos oportunidade de abordar 35 indivíduos atingidos por TP, todos VIH negativos e sem toxicodpendência, os quais foram, logo na fase inicial, divididos em dois grupos (I e II) em função da expressão clínica da sua afecção:

- Grupo I, constituído por 15 doentes portadores de formas limitadas e clinicamente moderadas (lesões circunscritas, unilaterais, sem cavernas ou diminutamente escavadas, escassamente bacilíferas e sem notórias repercussões sobre o estado geral). 13 eram do sexo masculino e 2 do feminino, com uma média de idades de  $45.6 \pm 18.2$  anos. Neste conjunto, 6 eram fumadores (carga tabágica de  $31.9 \pm 3.4$  maços/ano) e 9 não referiam hábitos tabágicos.
- Grupo II, formado por 20 pacientes atingidos por lesões graves (muito extensas e multiescavadas, frequentemente bilaterais, com um importante componente exsudativo, muito bacilíferas, por vezes multirresistentes, com acentuado

rebate sobre o estado geral e, nalguns casos, com múltiplos factores de risco). Integravam este conjunto 14 homens e 6 mulheres, com uma média de idades de  $41.8 \pm 14.3$  anos. 12 deles eram fumadores (carga tabágica de  $32.8 \pm 4.8$  maços/ano) e 8 não fumadores.

- Na perspectiva de apreciar a eventual influência que os doentes multirresistentes, integrados no Grupo II, pudessem exercer sobre os resultados globais deste conjunto, considerámos, igualmente, a sua análise (Grupo R, constituído por 7 multirresistentes e Grupo II-R, correspondente ao que restava do Grupo II após a separação desses indivíduos, e que assim abrangia 13 doentes), quer individualmente, quer comparativamente aos restantes grupos estudados.

**b – Métodos**

A metodologia utilizada, dirigida à avaliação da imunidade celular e humoral, tanto nas áreas lesadas, através da lavagem broncoalveolar (LBA), como no sangue periférico, compreendeu os seguintes passos:

- Determinação da celularidade total e percentual do LLBA, com câmara de NEUBAUER e leitura por microscopia óptica.
- Avaliação da imunidade celular, com anticorpos monoclonais e leitura por citometria de fluxo, através das seguintes parâmetros:
  - Contagem das populações linfocitárias CD3 e das subpopulações CD4, CD8 e  $\gamma/\delta$ .
  - Estudo da actividade *natural Killer* (NK) a partir da subpopulação CD16 CD56.
  - Contagem dos fenótipos linfocitários Th1 (CD4+CD7+) e Th2 (CD4+CD7-)
- Avaliação da imunidade humoral, com base nas seguintes determinações:
  - Contagem da população linfocitária CD19, com anticorpos monoclonais e leitura por citometria de fluxo.
  - Doseamento, apenas no sangue, das imunoglobulinas A (IgA), G (IgG) e M (IgM) e das fracções C3 e C4 do complemento, por neflo-

metria.

- Doseamento da alfa-1-antitripsina ( $\alpha$ -1-AT) por neflometria.
- Determinação dos níveis intracelulares das citocinas gama-interferom ( $\gamma$ -INF) e interleucina-4 (IL-4), após estimulação com mitogénio proliferativo, por citometria de fluxo.
- Avaliação da capacidade funcional global dos macrófagos alveolares das áreas atingidas, através da auto-fluorescência destas células, em dois canais (FL1 e FL2), por citometria de fluxo, com contagens acima dos 10, 100 e 1000 canais.

A análise estatística dos resultados foi conduzida através das seguintes técnicas:

- Análise da variância
- Teste t-student
- Médias e desvios padrões
- Correlação linear

## RESULTADOS

### A – Dos Grupos I e II

#### Celularidade do LLBA

Como se aguardava, todos os doentes apresentavam uma alveolite, embora com características e intensidade diferentes em função da gravidade da situação clínica. Com efeito, o número total de células/mm<sup>3</sup> (Fig. 1) era de 226±183 no Grupo II, enquanto que no conjunto de formas menos graves (Grupo I) não ultrapassava 219±176, traduzindo, assim, um moderado processo inflamatório, ligeiramente mais intenso nas situações de maior gravidade.

Pelo que diz respeito à distribuição percentual dos diferentes elementos celulares (Fig. 1), pôde-se

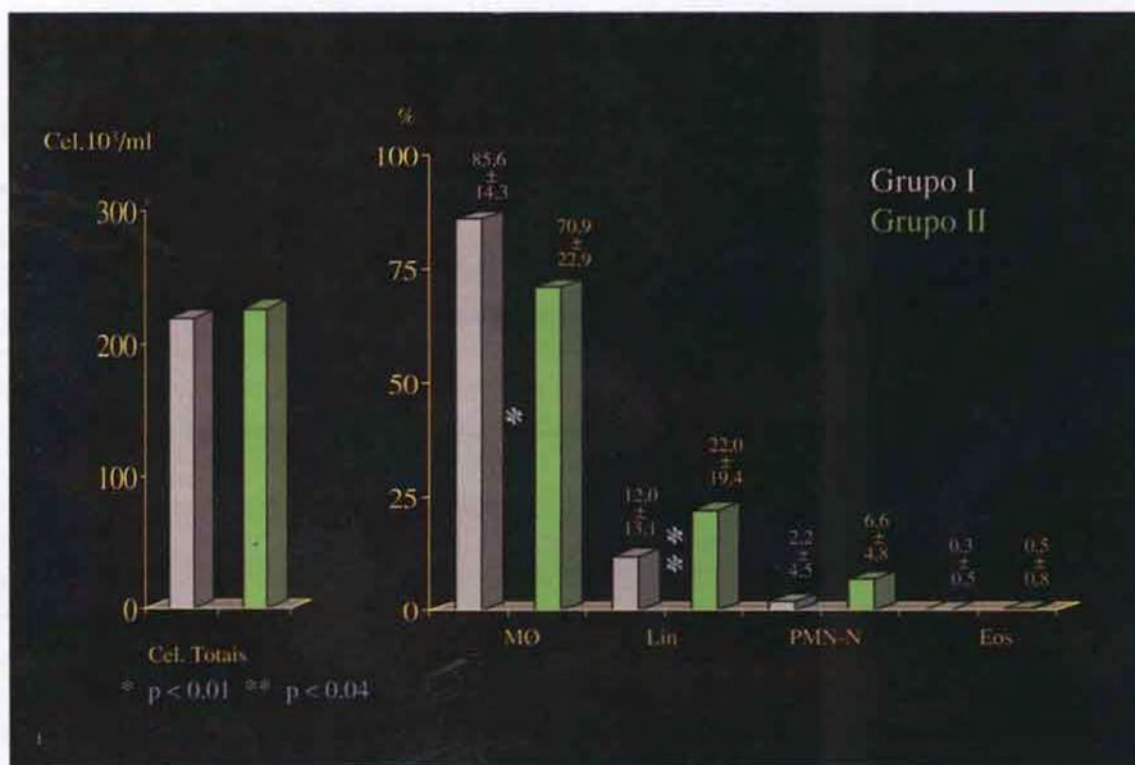


Fig. 1 – Celularidade total e percentual do LLBA (Grupos I e II)

constatar que, nas regiões lesadas, os doentes do Grupo I apresentavam um número significativamente ( $p < 0.01$ ) maior de macrófagos ( $85.6 \pm 14.3/70.9 \pm 22.9\%$ ), mas a quantidade de linfócitos revelou-se significativa ( $p < 0.04$ ) e anormalmente elevada nas formas mais graves ( $22.0 \pm 19.4\%$ ) em relação às formas menos graves ( $12.0 \pm 13.1\%$ ). No Grupo II, a percentagem de polimorfonucleares neutrófilos ultrapassava ligeiramente o limite superior da normalidade ( $6.6 \pm 4.8\%$ ).

Os eosinófilos encontravam-se em valores diminuídos e praticamente sobreponíveis nos dois conjuntos estudados ( $0.3 \pm 0.5\%$  no Grupo I e  $0.5 \pm 0.8\%$  no Grupo II).

Dir-se-ia, assim, que a alveolite dos indivíduos com situações tuberculosas ligeiras apresentava uma normal distribuição dos diversos elementos celulares, com predomínio macrófágico, enquanto que a das formas mais graves exibía uma moderada linfocitose acompanhada de um ligeiro aumento do número de polimorfonucleares neutrófilos.

### **Resposta Imunitária Celular**

Os doentes com formas mais graves reagiram, no órgão lesado, com um maior número de células T (Fig. 2) ( $92.1 \pm 7.7\%$ ) e da sua subpopulação CD4 ( $51.4 \pm 19.6\%$ ) em relação às situações menos graves ( $87.5 \pm 11.7\%$  de CD3 e  $47.3 \pm 16.5\%$  de CD4). Entretanto, a subpopulação CD8 apresentava-se, no LLBA, com valores praticamente sobreponíveis nos dois conjuntos analisados ( $34.0 \pm 12.9\%$  no Grupo I e  $33.9 \pm 14.6\%$  no Grupo II).

Nestas circunstâncias, a relação CD4/CD8 (Fig. 2) revelou-se ligeiramente superior nos indivíduos portadores de situações mais delicadas ( $1.7 \pm 1.3/2.2 \pm 2.1$ ).

No sangue periférico, os desvios observados, para além de se apresentarem menos significativos, ocorreram num sentido inverso ao que foi observado no LLBA (Fig. 3). Com efeito, o número de linfócitos CD4 predominava no Grupo I ( $45.1 \pm 12.4\%$ ) em relação ao Grupo II ( $36.1 \pm 9.1\%$ ), enquanto que as

células CD8 se encontravam em maior quantidade nas formas mais graves ( $32.9 \pm 12.5\%$ ), por comparação com as menos graves ( $29.5 \pm 8.2\%$ ).

Nestas condições, a relação CD4/CD8 neste meio biológico (Fig. 3), e ao contrário do que ocorria no LLBA, exibía níveis mais elevados no Grupo I ( $1.7 \pm 0.8$ ) do que no Grupo II ( $1.3 \pm 0.7$ ).

No pulmão profundo, os linfócitos  $\gamma/\delta$  (Fig. 2) predominavam nas situações menos graves ( $3.9 \pm 2.7/2.7 \pm 2.1\%$ ), enquanto que no sangue periférico (Fig. 3) essa relação se invertia ( $3.9 \pm 2.4\%$  no Grupo I e  $5.0 \pm 3.2\%$  no Grupo II).

Por outro lado, a actividade NK estudada através da contagem das células CD16 CD56 (Fig. 4) revelou-se sempre muito mais elevada no sangue periférico ( $8.9 \pm 7.7\%$  no Grupo I e  $11.3 \pm 13.2\%$  no Grupo II) do que no LLBA ( $3.1 \pm 2.3\%$  no Grupo I e  $2.5 \pm 2.4\%$  no Grupo II).

Assim, a actividade NK diminuía com a gravidade da situação nas áreas pulmonares afectadas, enquanto que no sangue periférico essa variação ocorria em sentido oposto.

### **Resposta Imunitária Humoral**

A população linfocitária B (Fig. 5) apresentou-se sempre com valores muito mais elevados no sangue ( $9.1 \pm 5.1\%$  no Grupo I e  $9.9 \pm 7.6\%$  no Grupo II) do que no pulmão profundo ( $0.6 \pm 0.7\%$  no Grupo I e  $0.8 \pm 0.9\%$  no Grupo II). No entanto, não nos pareceu que a gravidade da situação clínica condicionasse a existência de diferenças significativas entre os dois conjuntos considerados.

Quanto às imunoglobulinas (Fig. 6), o seu doseamento, apenas efectuado no sangue periférico, veio mostrar a presença de valores ligeiramente situados acima da normalidade, tanto para a IgG como para a IgA, mas relativamente próximos quando analisados em função dos grupos estudados ( $1484 \pm 524/1517 \pm 416.7$  mgr% para a IgG;  $395.9 \pm 231.2/372.3 \pm 182.6$  mgr% para a IgA; e  $107.3 \pm 42.6/117.5 \pm 46.5$  mgr% para a IgM).



INFLUÊNCIA DOS PERFIS Th1/Th2 NO ESPECTRO DE GRAVIDADE DA TUBERCULOSE PULMONAR

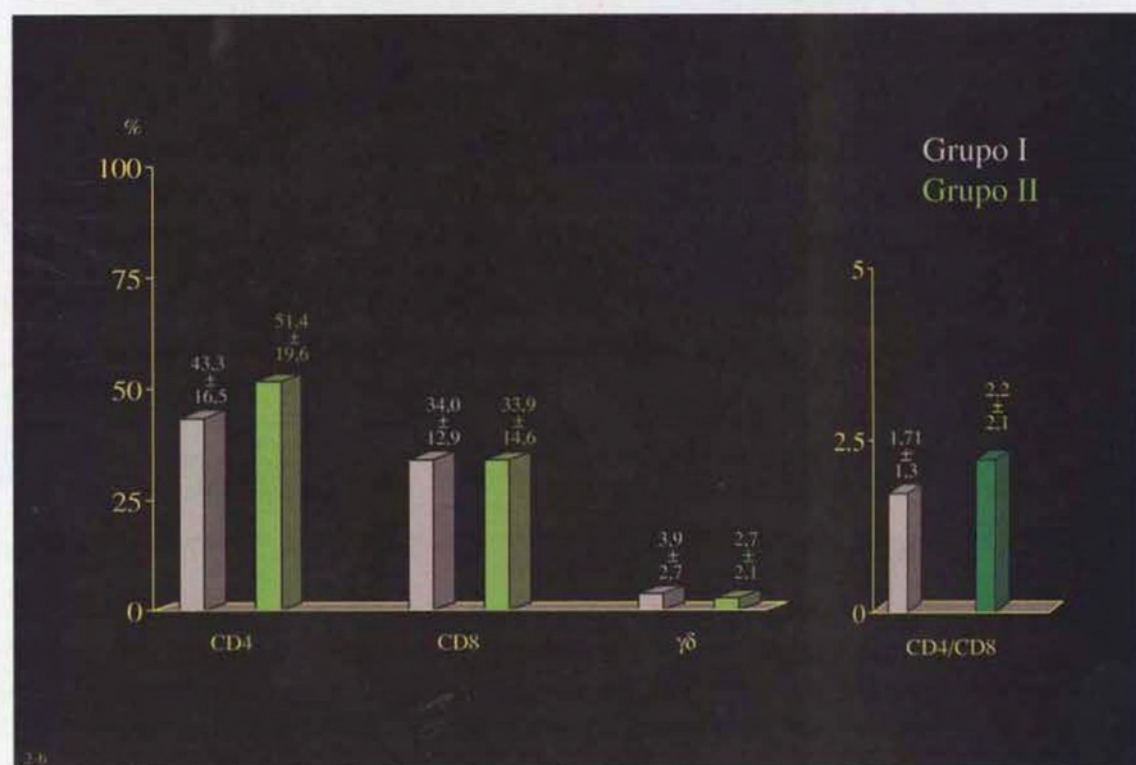
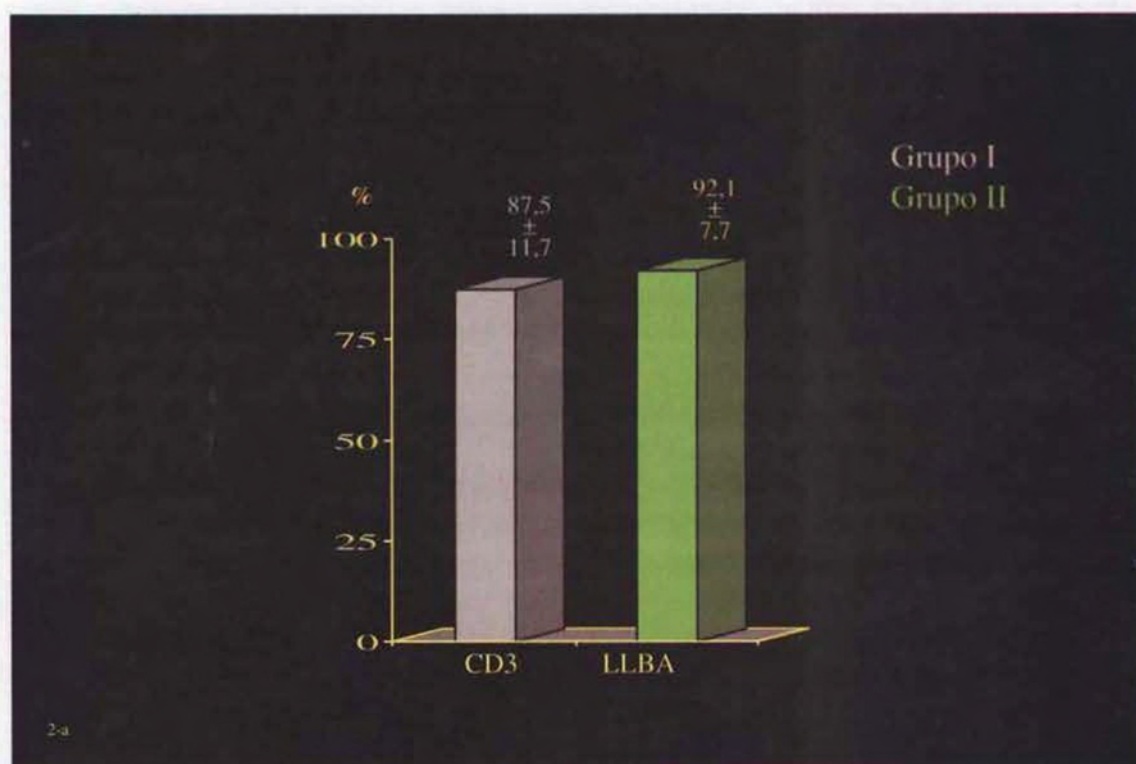


Fig. 2 – Populações (a) e subpopulações (b) linfocitárias no LLBA (Grupos I e II)

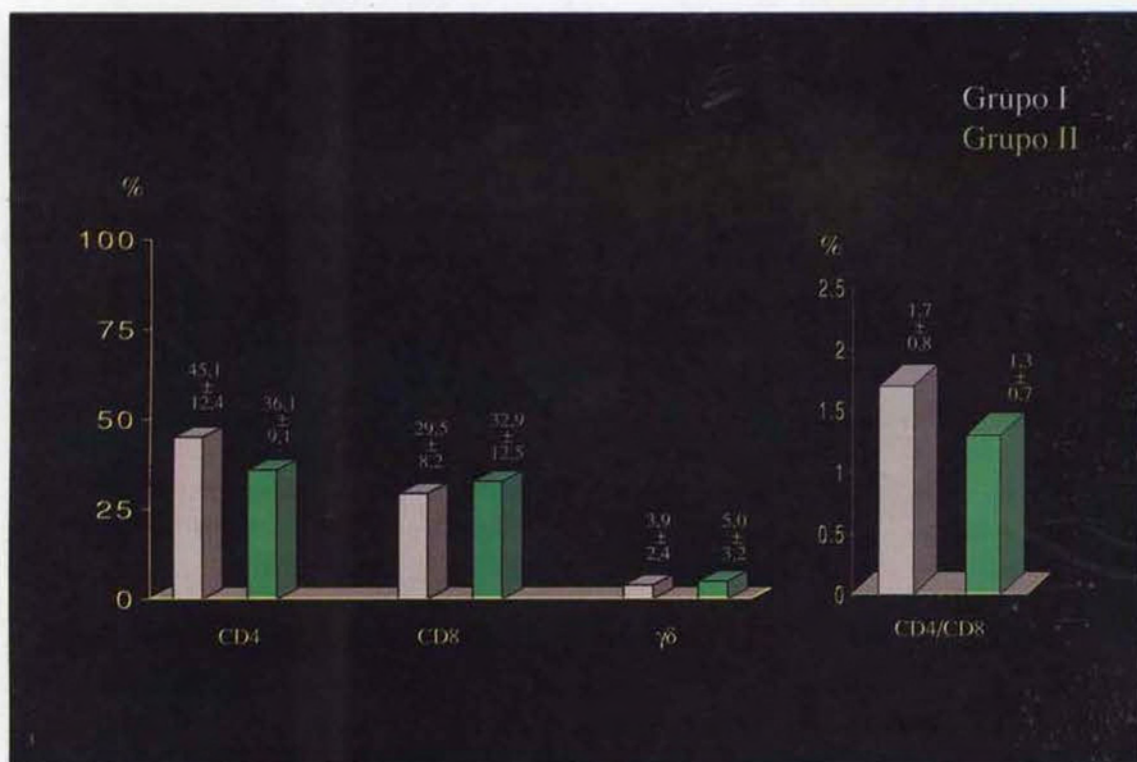


Fig. 3 – Subpopulações linfocitárias no sangue periférico (Grupos I e II)

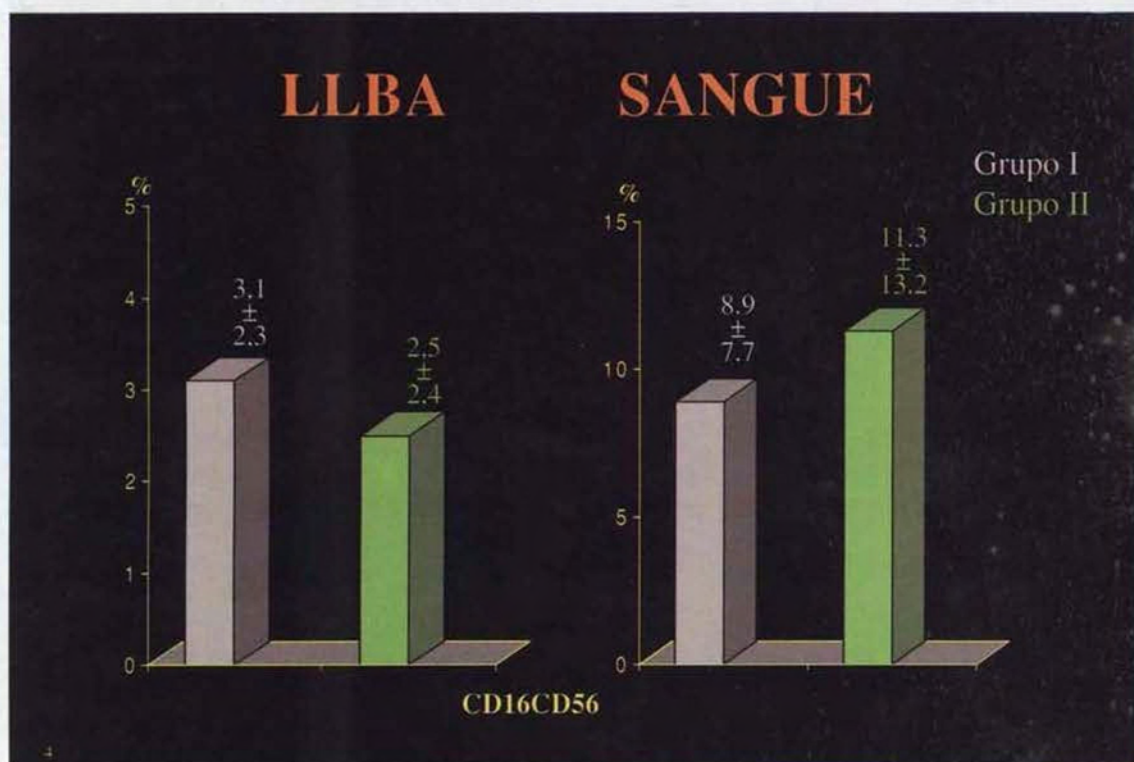


Fig. 4 – Actividade NK (CD16 CD56) no LLBA e no sangue periférico (Grupos I e II)

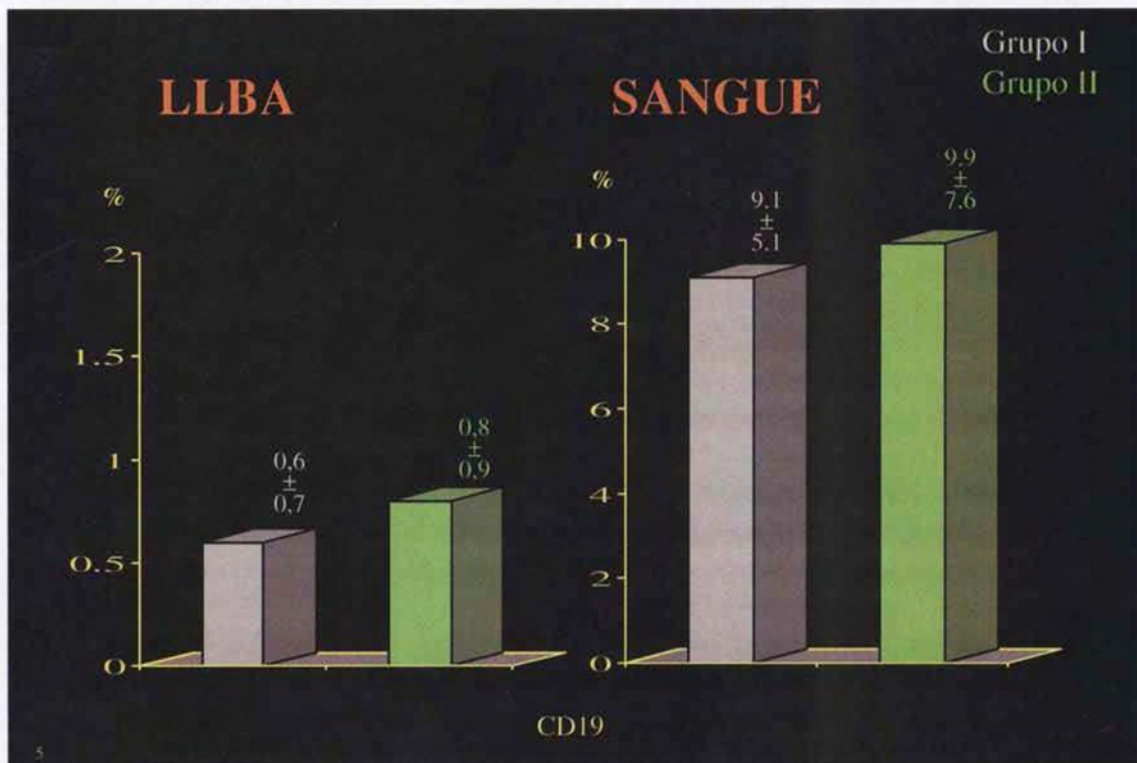


Fig. 5 – População linfocitária B no LLBA e no sangue periférico (Grupos I e II)

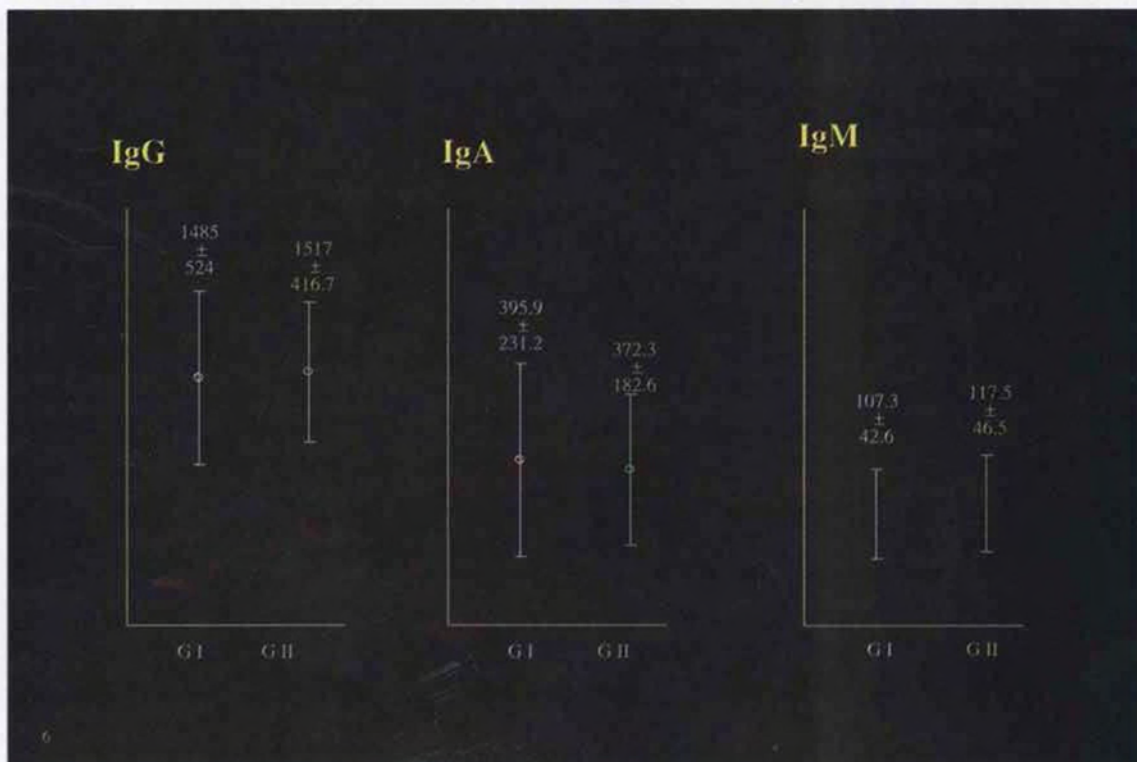


Fig. 6 – Imunoglobulinas G, A e M no sangue periférico (Grupos I e II)

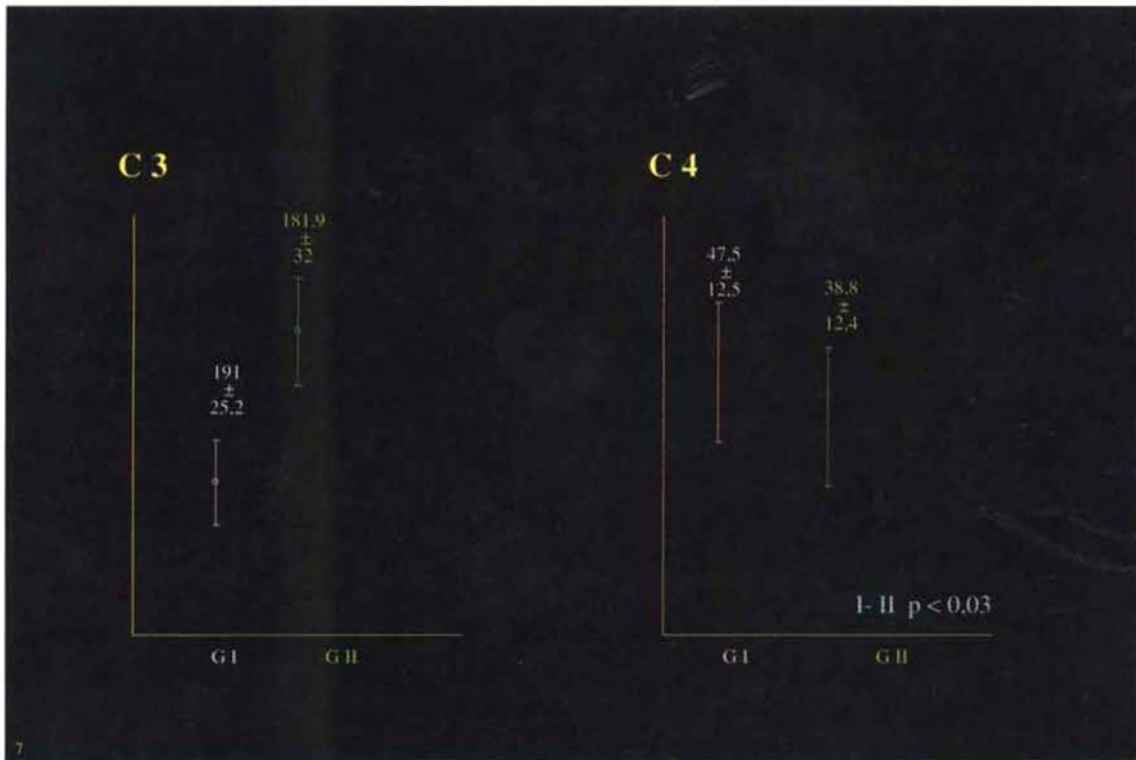


Fig. 7 - Frações C3 e C4 do Complemento no sangue periférico (Grupos I e II)

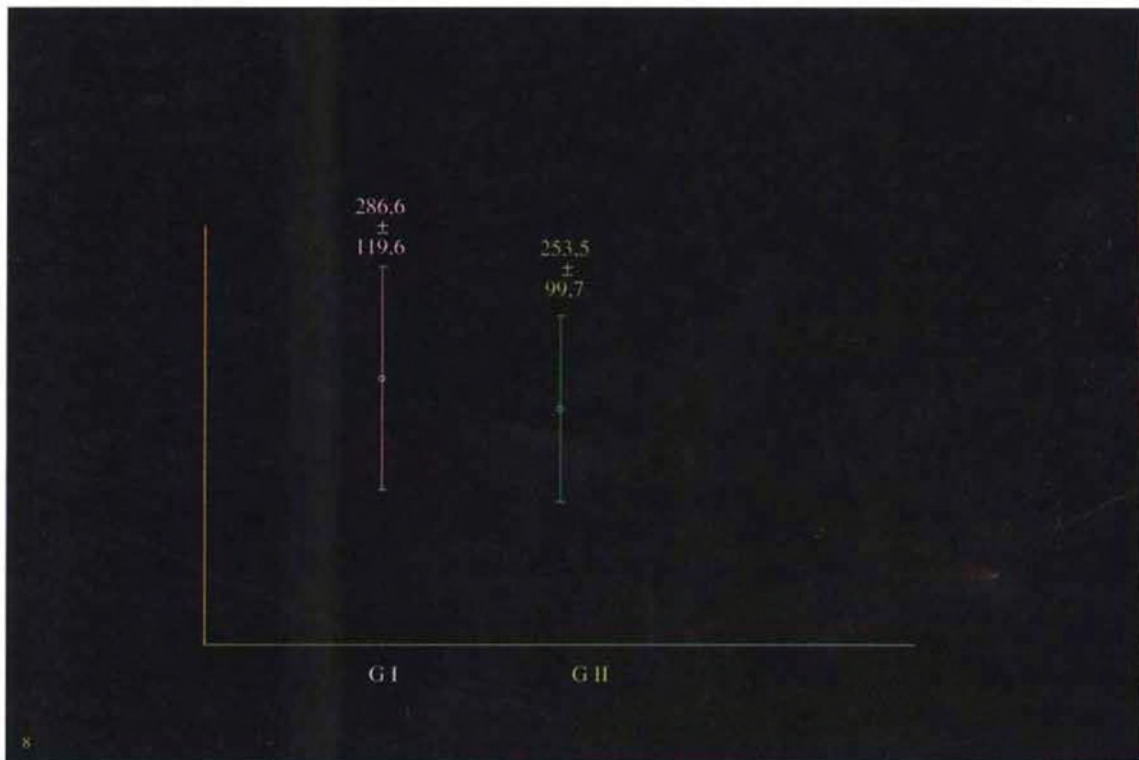


Fig. 8 -  $\alpha$ -1-Antitripsina no sangue periférico (Grupos I e II)

As frações do Complemento analisadas (Fig. 7) apresentavam níveis de C4 ligeiramente elevados nas situações clínicas menos graves, embora com significado estatístico ( $p < 0.03$ ) em relação ao Grupo II ( $47.5 \pm 12.5 / 38.8 \pm 12.4$  mgr%). Já pelo que diz respeito à fração C3, esse desvio era mais acentuado, mas sem diferenças estatisticamente significativas ( $191 \pm 252 / 181.9 \pm 32$  mgr%) entre os grupos considerados.

Quanto à  $\alpha$ -1-AT (Fig. 8), os seus valores sanguíneos situavam-se acima do nível da normalidade ( $286.6 \pm 119.6$  mgr% no Grupo I e  $253.5 \pm 99.7$  no Grupo II).

**Perfis Th1/Th2 – celulares e citocínicos**

Os fenótipos linfocitários Th1 (Fig. 9) apresentavam, nas áreas pulmonares lesadas, níveis significativamente ( $p < 0.04$ ) mais elevados nas situações clinicamente menos graves, em relação às mais graves

( $30.9 \pm 14.3\%$  no Grupo I e  $24.3 \pm 9.7\%$  no Grupo II). Pelo contrário, nesse meio biológico, as células Th2 (Fig. 10) revelavam valores significativamente ( $p < 0.001$ ) superiores nas formas graves ( $16.4 \pm 7.5\%$  no Grupo I e  $27.2 \pm 11.6\%$  no Grupo II).

Assim, enquanto que no Grupo I as células Th1 predominam sobre as Th2, essa relação invertia-se no Grupo II (Fig. 11).

Curiosamente, no sangue periférico (Fig. 12) as células Th1 encontravam-se sempre em maior número do que as Th2, independentemente da gravidade da situação clínica, aliás com diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre os dois conjuntos ( $32.5 \pm 10.8 / 12.6 \pm 13.7\%$  no Grupo I e  $28.4 \pm 9.3 / 7.6 \pm 4.1\%$  no Grupo II).

O espectro citocínico (Fig. 13) acompanhava o celular. Com efeito, nas regiões pulmonares atingidas, o  $\gamma$ -INF predominava significativamente ( $p < 0.0002$ ) no Grupo I ( $21.2 \pm 3.4 / 7.3 \pm 1.8\%$ ), enquanto que a IL-4 se apresentava significativamente ( $p < 0.0004$ ) mais

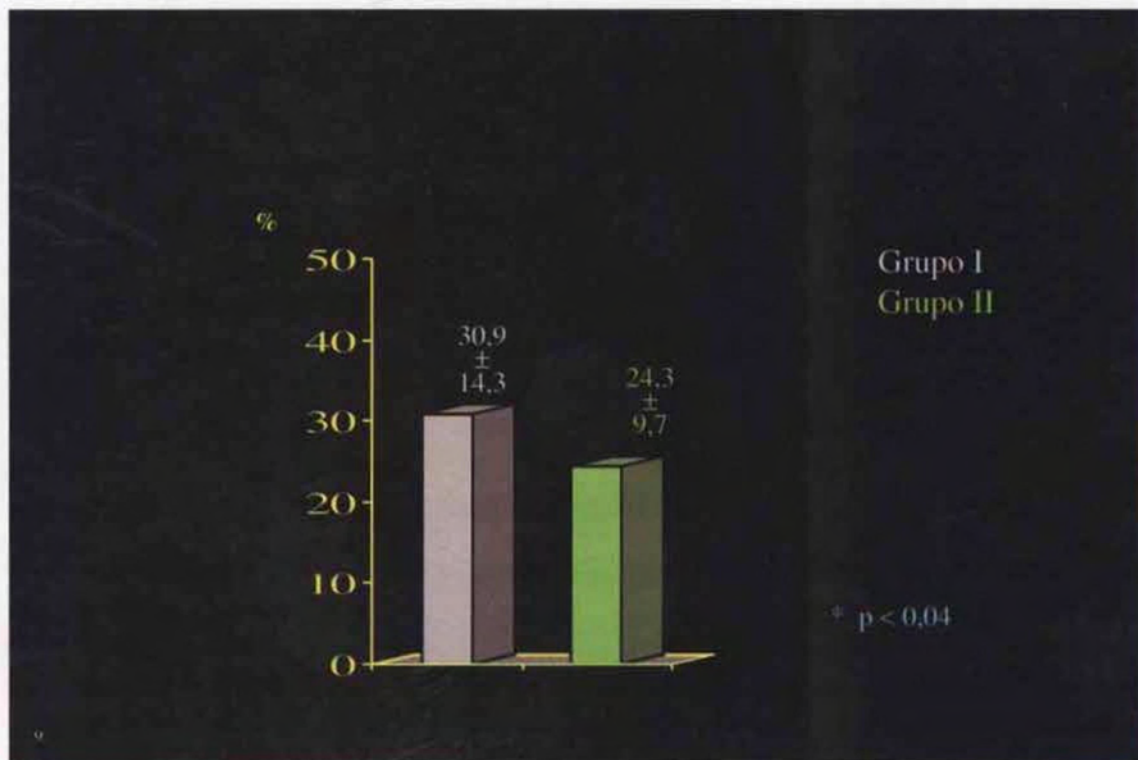


Fig. 9 – Fenótipos linfocitários Th1 no LLBA (Grupos I e II)

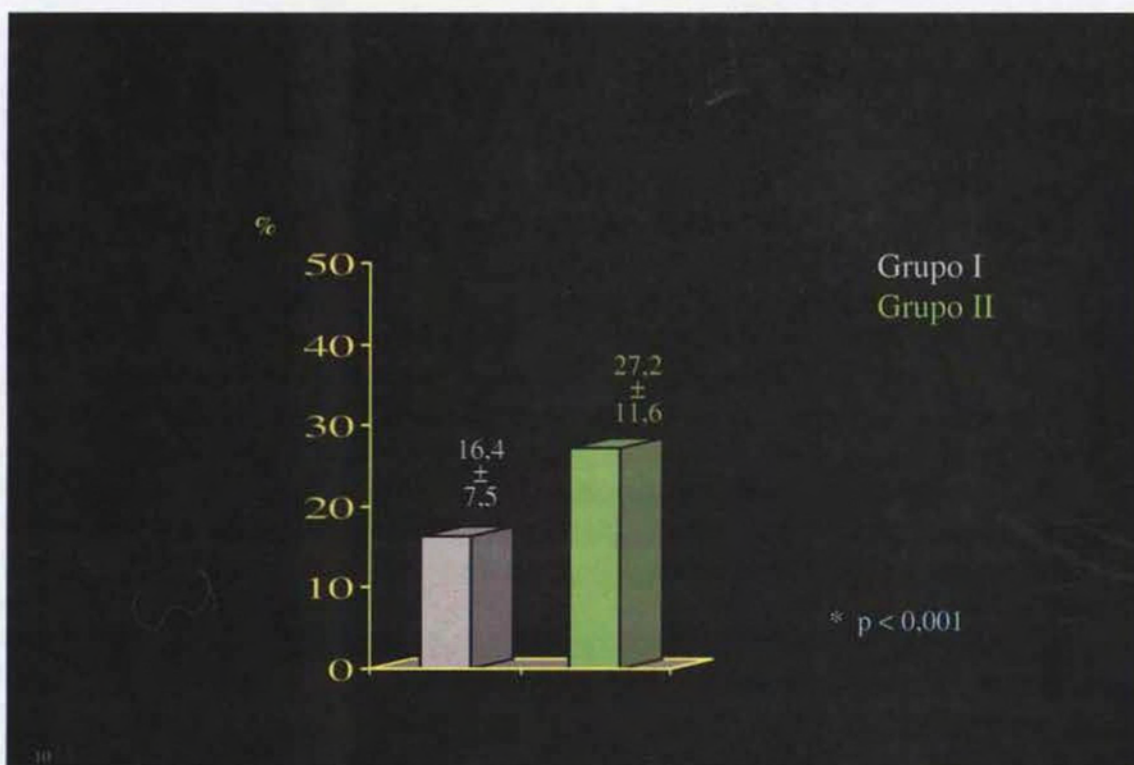


Fig. 10 – Fenótipos linfocitários Th2 no LLBA (Grupos I e II)

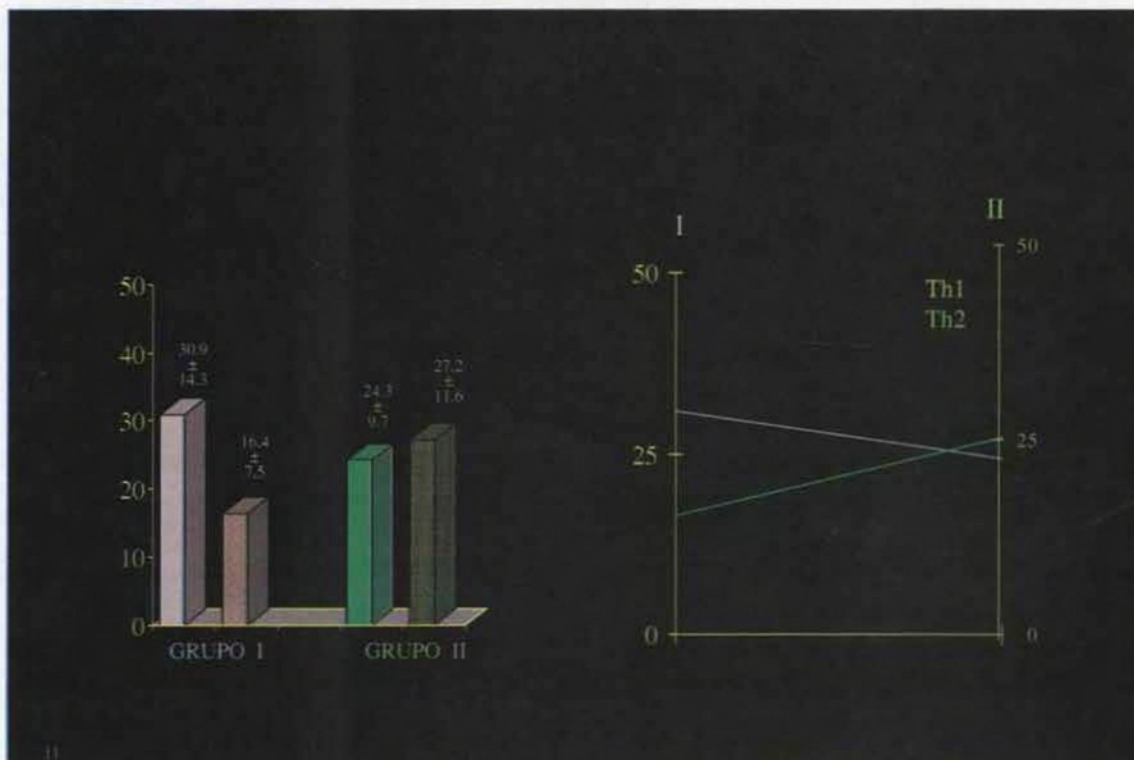


Fig. 11 – Fenótipos Th1/Th2 (Grupos I e II) no LLBA

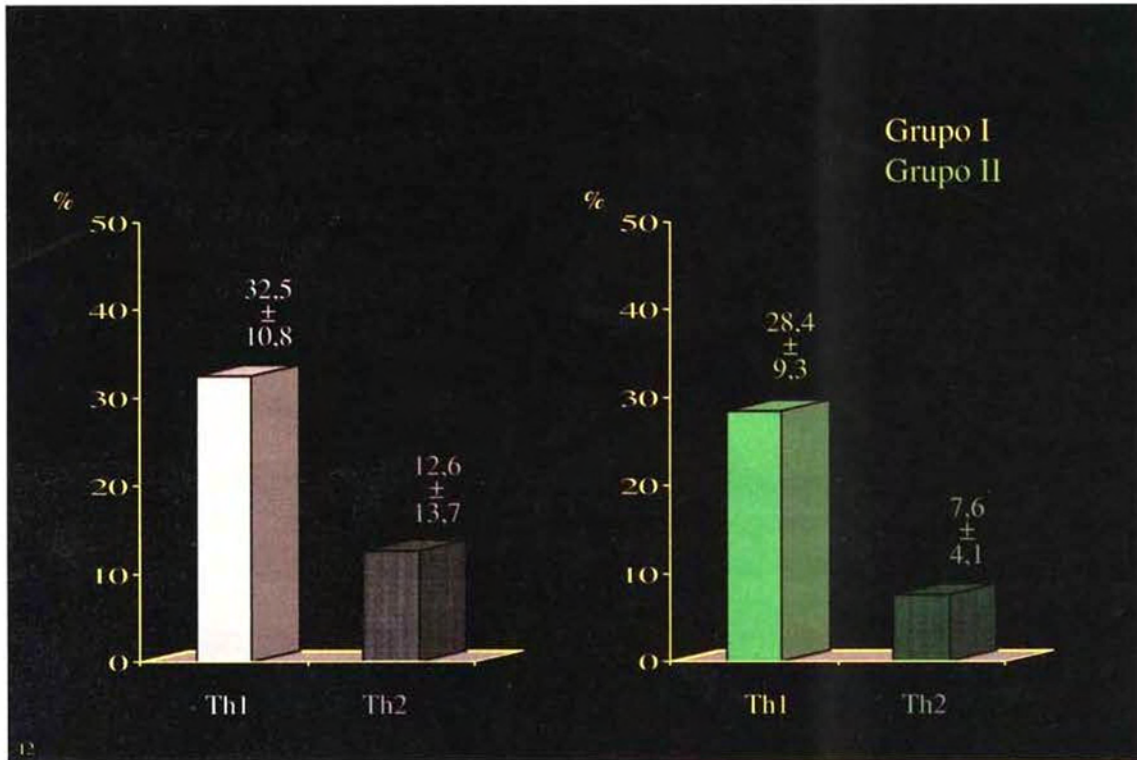


Fig. 12 – Fenótipos linfocitários Th1/Th2 (Grupos I e II) no sangue periférico

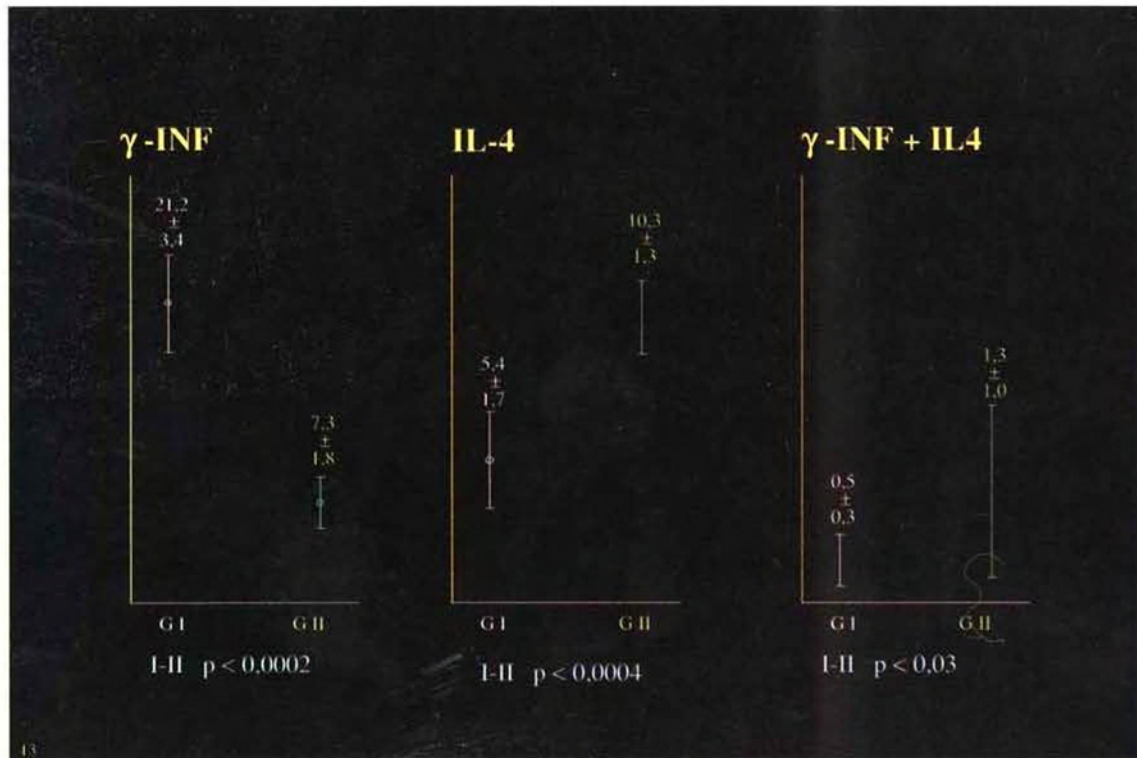


Fig. 13 – γ-INF e IL-4 no LLBA (Grupos I e II)

elevada no Grupo II ( $5.4 \pm 1.7 / 10.3 \pm 1.3\%$ ), aliás como a associação  $\gamma$ -INF + IL-4 ( $0.5 \pm 0.3\%$  no Grupo I e  $1.3 \pm 1.0\%$  no Grupo II -  $p < 0.003$ ). Pelo contrário, no sangue periférico (Fig. 14),  $\gamma$ -INF encontrava-se invariável e significativamente ( $p < 0.002$ ) em níveis superiores, tanto nas formas clínicas menos graves, como nas mais graves ( $26.1 \pm 3.7\%$  de  $\gamma$ -INF e  $9.0 \pm 2.6\%$  de IL-4 no Grupo I;  $17.6 \pm 2.4\%$  de  $\gamma$ -INF e  $8.6 \pm 2.7\%$  de IL-4 no Grupo II).

que foram determinadas, encontram-se exemplificadas nas Figs.15 a 18.

**Auto-Fluorescência dos Macrófagos Alveolares**

A auto-fluorescência das células macrofágicas presentes no LLBA (Fig. 19) diminuía, em qualquer das determinações efectuadas, a par da gravidade da situação clínica, particularmente nas leituras acima dos

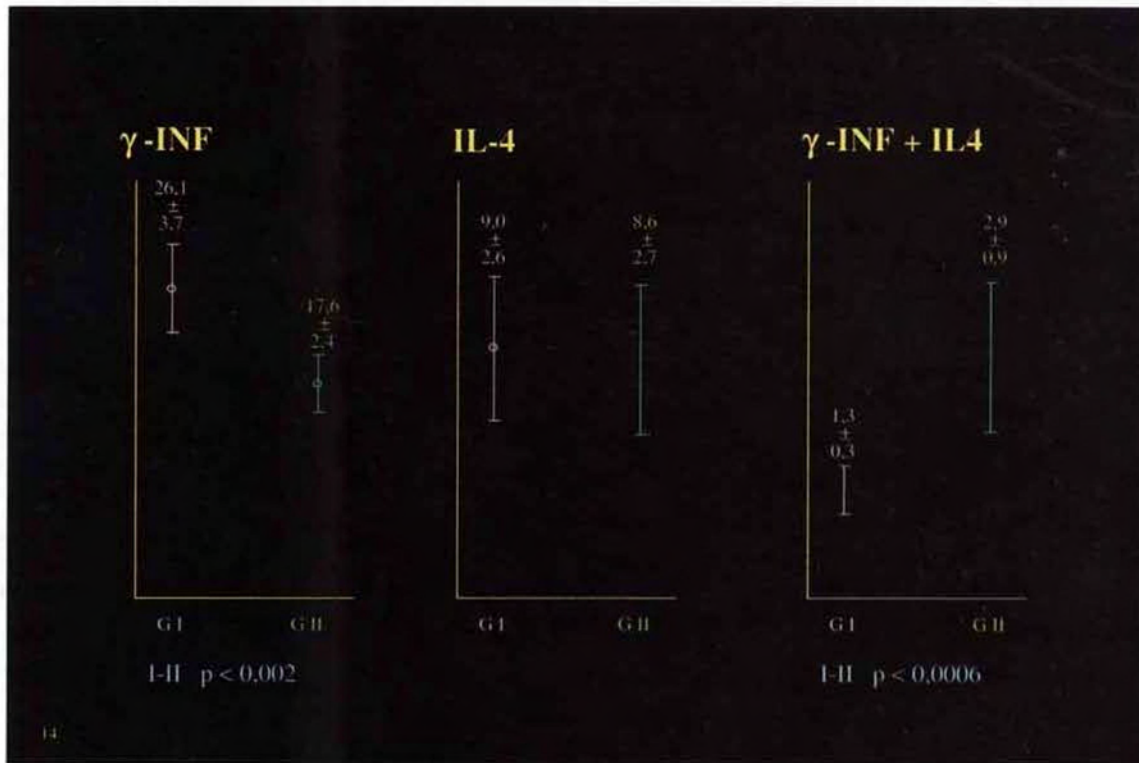


Fig. 14 –  $\gamma$ -INF e IL-4 no sangue periférico (Grupos I e II)

A associação  $\gamma$ -INF+IL-4 (Th0) predominava, aliás significativamente ( $p < 0.0006$ ), nas situações clinicamente mais gravosas ( $1.3 \pm 0.3\%$  no Grupo I e  $2.9 \pm 0.9\%$  no Grupo II).

As variações dos fenótipos linfocitários Th1/Th2, assim como das citocinas  $\gamma$ -INF/IL4, em função da gravidade da situação clínica e do meio biológico em

100 canais, onde se observou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre os dois conjuntos de doentes estudados (Grupo I e II) –  $55.8 \pm 26.9 / 46.2 \pm 16.8\% > 10$  canais;  $40.8 \pm 26 / 6.0 \pm 72\% > 100$  canais;  $5.8 \pm 7.7 / 0.2 \pm 0.6\% > 1000$  canais.

Os exemplos presentes nas Figs. 20 e 21 são disso bem elucidativos.



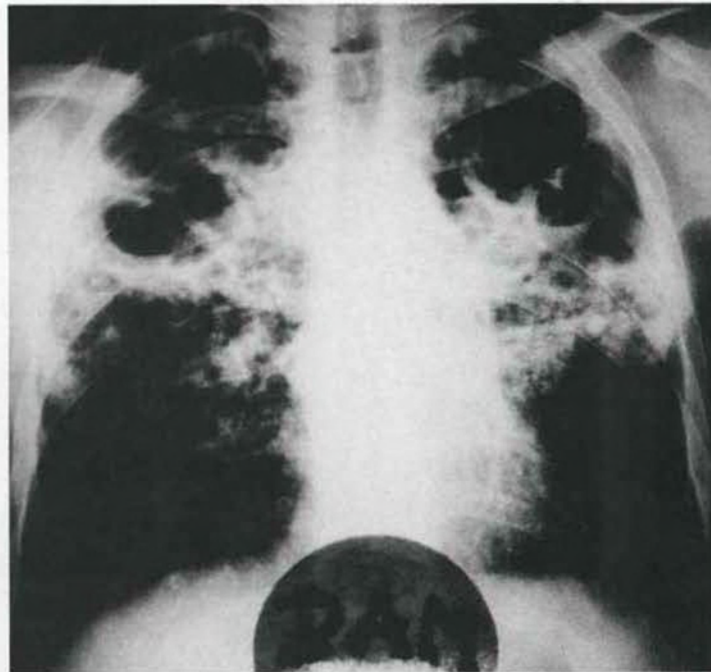


Fig. 15 – Telerradiografia torácica de um doente com uma forma clinicamente grave de tuberculose pulmonar (Grupo II)

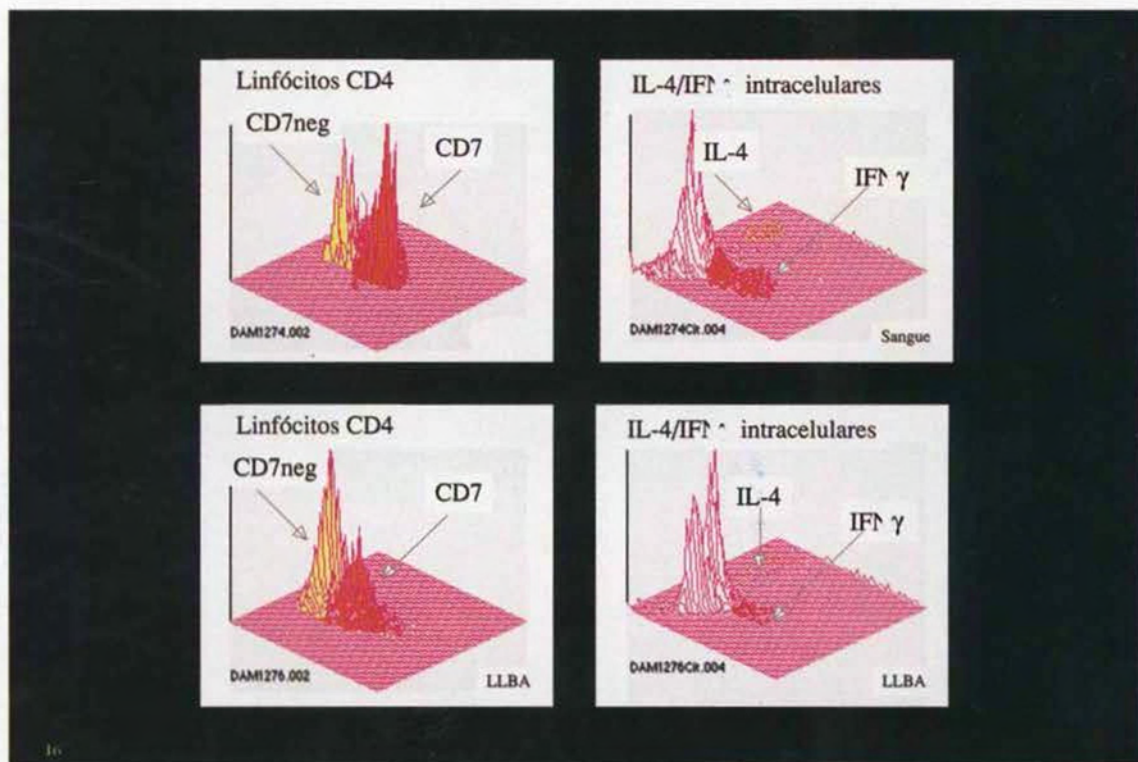


Fig. 16 – Perfis Th1/Th2 (celular e citocínico) obtidos por citometria de fluxo, no LLBA e no sangue periférico, do indivíduo correspondente à Fig. 15 (Grupo II)

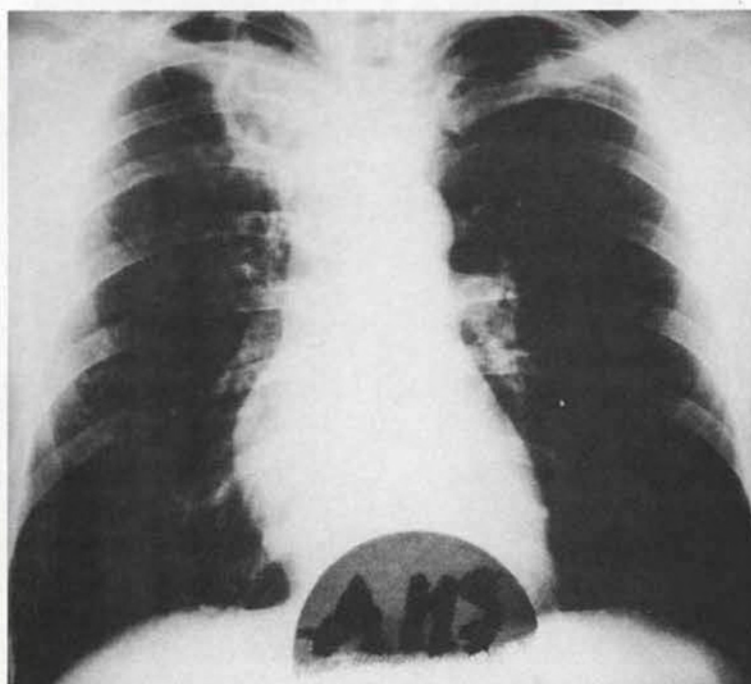


Fig. 17 – Telerradiografia torácica de um doente com uma situação clinicamente menos grave de tuberculose pulmonar (Grupo I)

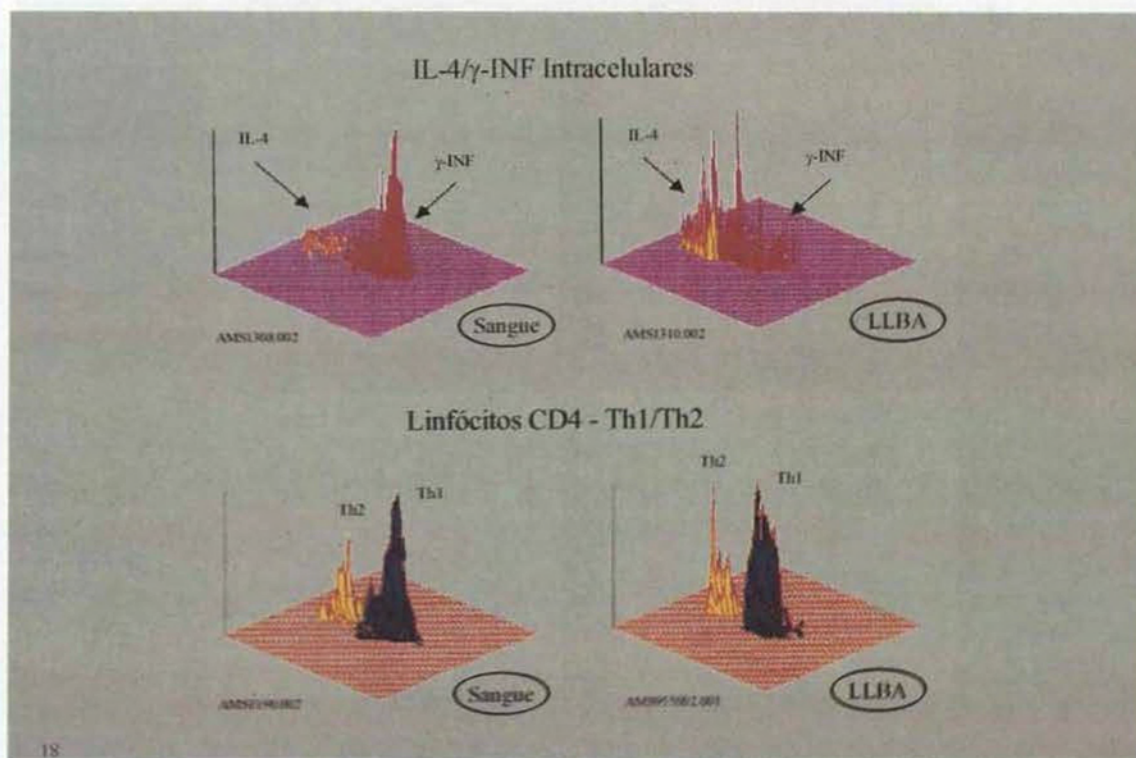


Fig. 18 – Perfis Th1/Th2 (celular e citocínico) obtidos por citometria de fluxo, no LLBA e no sangue periférico, do doente correspondente à Fig. 17 (Grupo I)

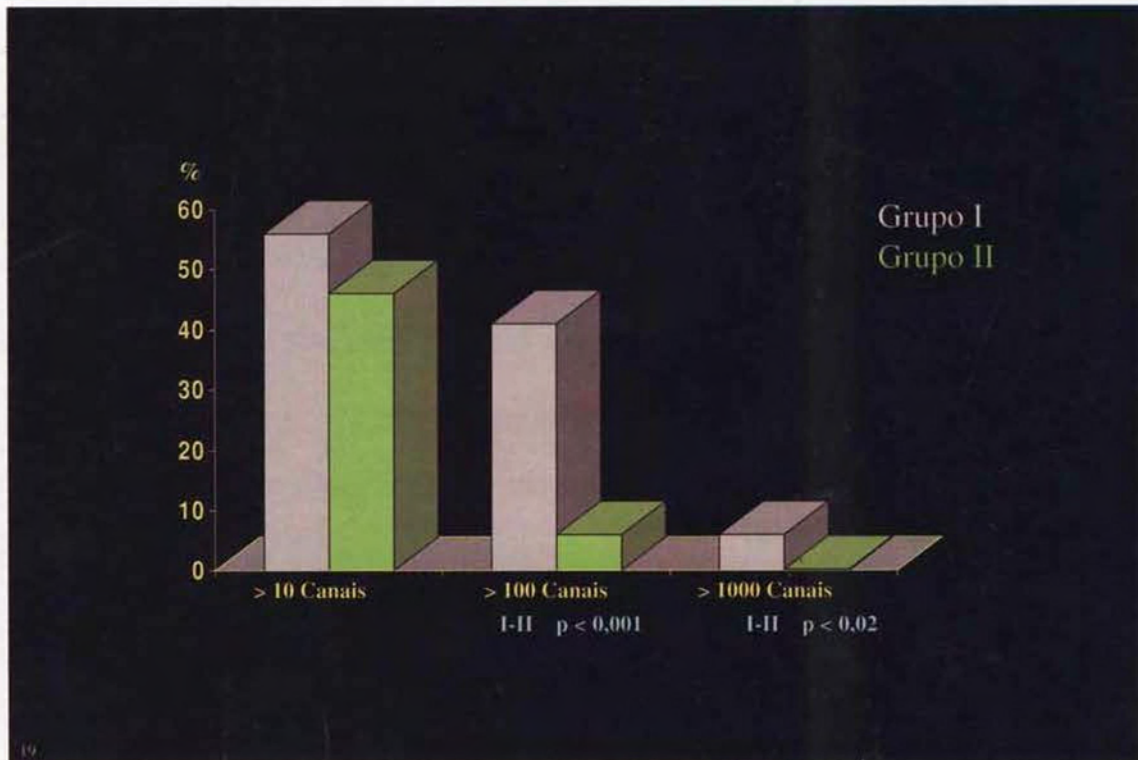


Fig. 19 – Auto-fluorescência dos macrófagos alveolares recolhidos por LBA (Grupos I e II)

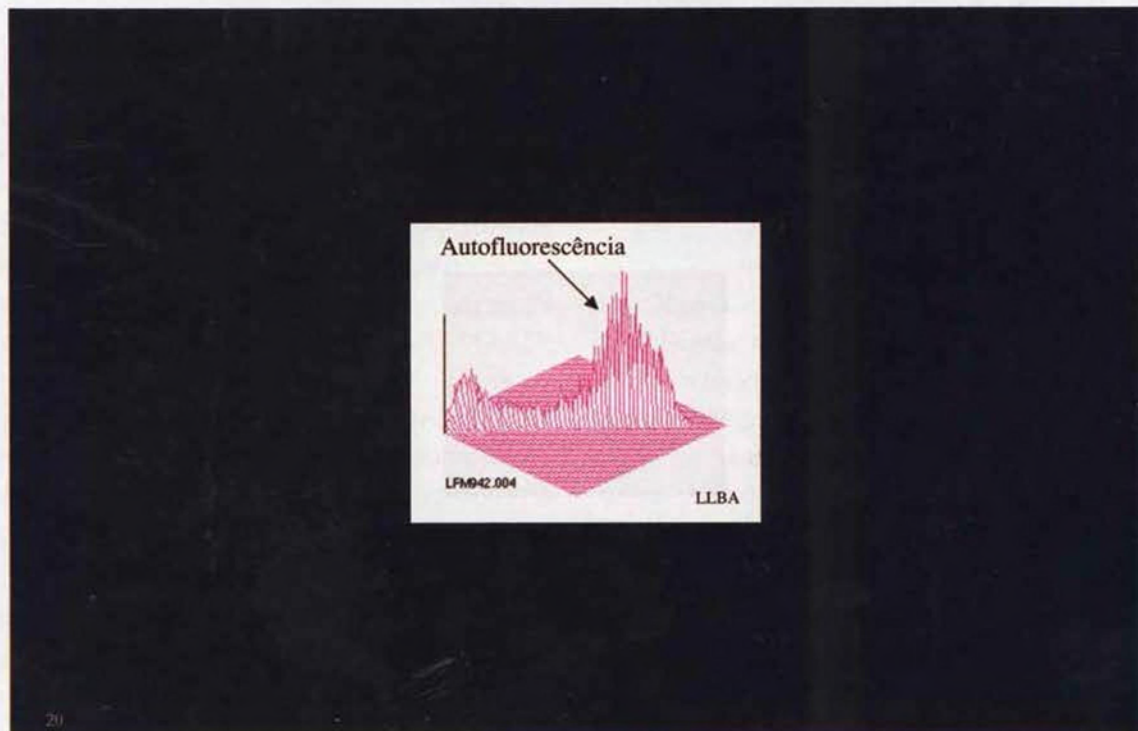


Fig. 20 – Auto-fluorescência dos macrófagos alveolares correspondentes a um indivíduo com uma situação menos grave de tuberculose pulmonar (Grupo I), determinada por citometria de fluxo

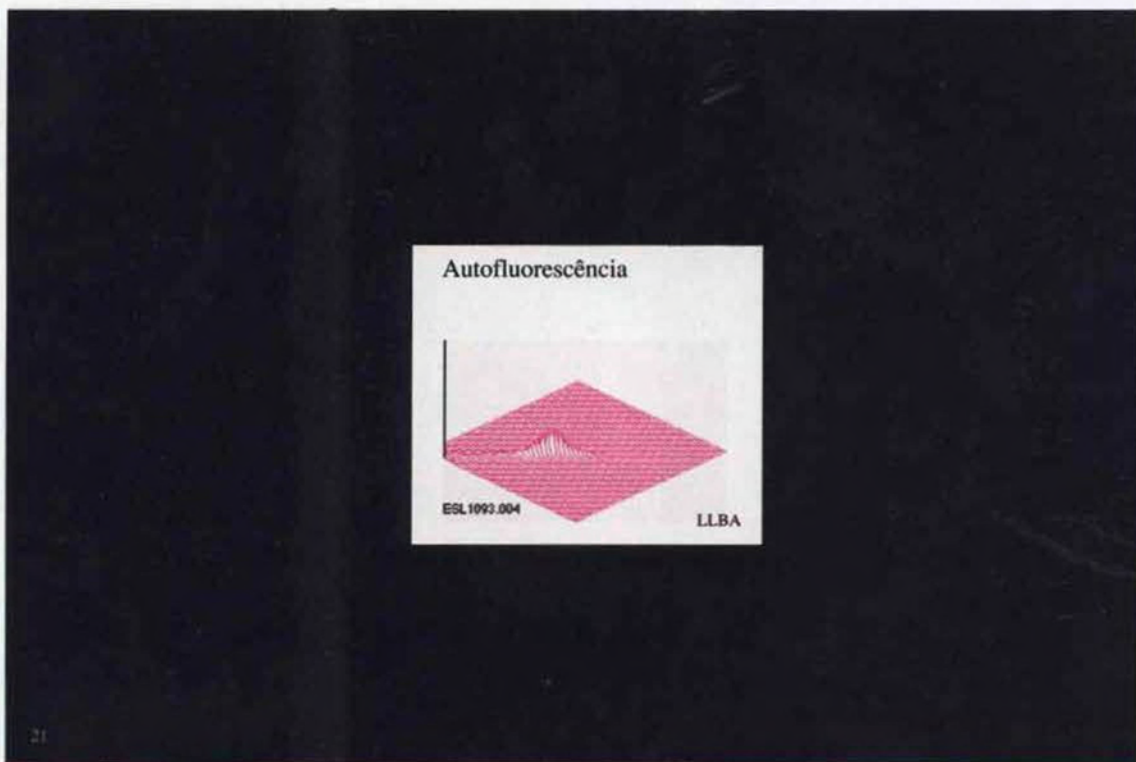


Fig. 21 – Auto-fluorescência dos macrófagos alveolares obtidos através de LBA, num doente com uma forma clinicamente grave de tuberculose pulmonar (Grupo II), determinada por citometria de fluxo

## B – Dos Grupos R e II-R

### *Celularidade do LLBA*

A alveolite dos indivíduos resistentes à medicação (Grupo R) apresentava valores mais elevados da celularidade total (Fig. 22) –  $264 \pm 241$  células /mm<sup>3</sup> – em relação ao conjunto global que integrava o Grupo II -  $226 \pm 183$  células/mm<sup>3</sup> - e, obviamente, ao Grupo II-R -  $206 \pm 151$  células/mm<sup>3</sup> - parecendo, assim, influenciar a contagem das células totais presentes no LLBA dos doentes mais graves.

Quanto à distribuição dos diferentes elementos celulares, assinala-se, no Grupo R, um desvio no mesmo sentido (Fig. 23) da percentagem de linfócitos ( $27.5 \pm 25.7\%$ ) e um afastamento em sentido contrário do número de polimorfonucleares neutrófilos ( $4.0 \pm 5.8\%$ ). Nestas circunstâncias, face a uma dimi-

nuição, embora ligeira, das células linfocitárias no Grupo II-R ( $19.1 \pm 15.4\%$ ) e a um aumento dos neutrófilos ( $8.1 \pm 17.9\%$ ), não admirará que a percentagem de macrófagos tivesse igualmente variado nestes conjuntos, em função das oscilações observadas nos outros elementos celulares ( $67.8 \pm 25.2\%$  no Grupo R;  $72.6 \pm 22.4\%$  no II-R e  $70.9 \pm 22.9\%$  no Grupo II).

Assim, o pulmão profundo dos doentes com formas graves de tuberculose, para as quais contribuiu a resistência à medicação, contem mais células, na dependência de uma maior quantidade de linfócitos, o que acarreta uma queda relativa do número de fagócitos nessas áreas.

### *Resposta Imunitária Celular*

Os desvios relativos às populações e subpopulações linfocitárias do LLBA, correspondentes aos três

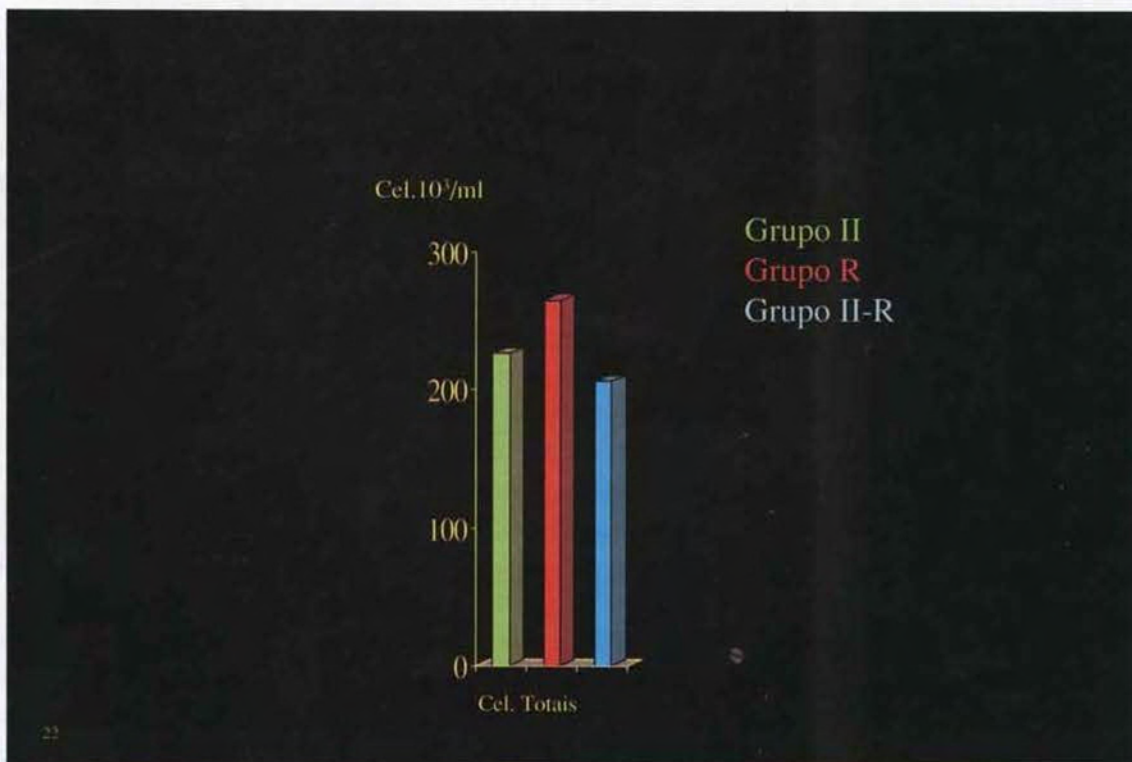


Fig. 22 – Celularidade total do LLBA nos indivíduos que integravam os Grupos R, II-R e II

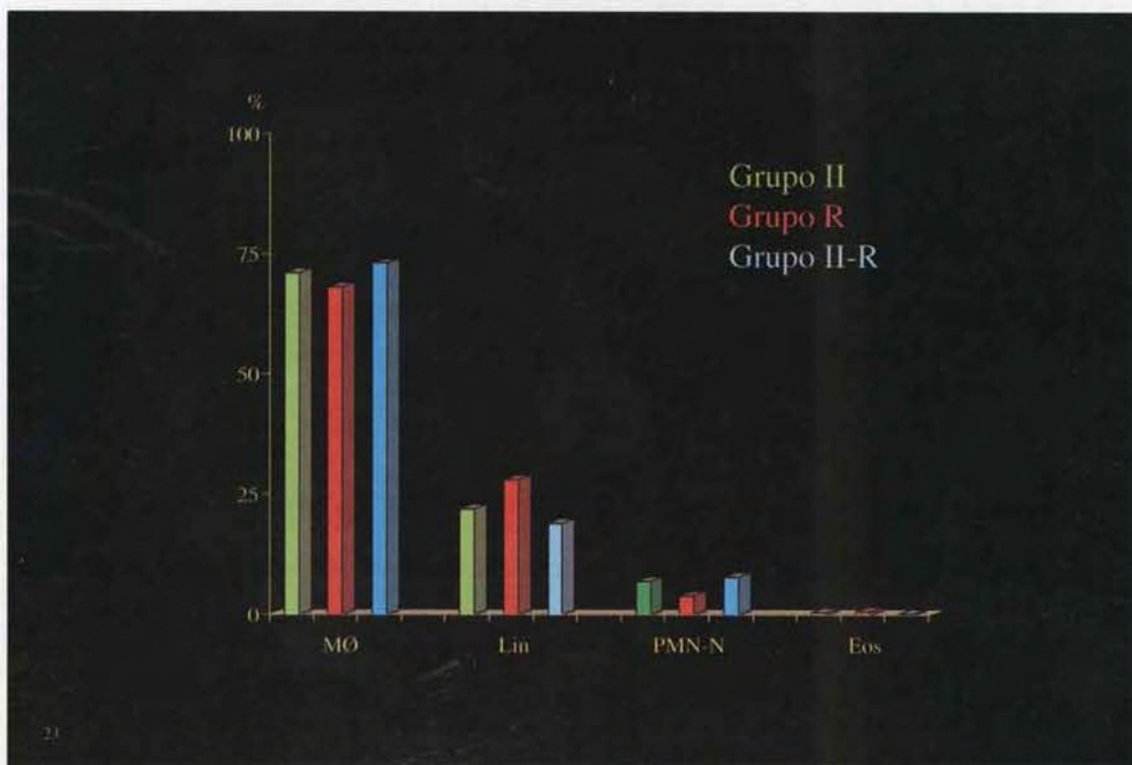


Fig. 23 – Celularidade percentual do LLBA nos doentes correspondentes aos Grupos R, II-R e II

conjuntos de doentes aqui em análise (Grupo R, II-R e II), quando existiam, não apresentavam qualquer expressão significativa como se pode constatar pela observação dos respectivos resultados (Fig. 24), apresentados pela ordem acima assinalada: CD3 (90.0 ± 11.0%/92.4 ± 5.4%/92.1 ± 7.7%); CD4 (49.9 ± 27.1%/52.3 ± 15.4%/54.1 ± 19.6%); CD8 (33.7 ± 18.6% /34.0 ± 12.8%/33.9 ± 14.6%); CD4/CD8 (2.4 ± 2.3/ 2.1 ± 2.0/ 2.2 ± 2.1).

Já em relação às células  $\gamma/\delta$  (Fig 24), verificou-se um ligeiro aumento entre os resistentes (3.2 ± 3.2% /2.3 ± 1.4%/2.7 ± 2.1%), enquanto que a actividade NK (Fig. 25) era aparentemente semelhante nos três grupos considerados (2.9 ± 3.4%/2.2 ± 1.8%/2.5 ± 2.4%), e muito próxima da do Grupo I (3.1 ± 2.3%).

No sangue (Fig. 26), salienta-se a diminuição das células CD3 no Grupo de resistentes (66.8 ± 13.0%), o que condicionava, assim, a elevação da percentagem destes elementos celulares nos restantes indivíduos do Grupo II (76.2 ± 14.7%), em relação à globalidade

desse Grupo (72.8 ± 14.5%). Curiosamente, existia agora uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.004$ ) na percentagem de células CD3, entre o Grupo R e o Grupo I. A moderada elevação do número de linfócitos CD4 nos resistentes (39.2 ± 10.9%), em relação aos não resistentes (34.4 ± 8.0%) e à totalidade dos indivíduos que integravam o Grupo II (36.1 ± 9.1%), permitiu reconhecer a presença de uma diferença significativa ( $p < 0.006$ ) quando se comparavam os Grupos II-R e I. Salienta-se a expressiva e significativa ( $p < 0.002$ ) queda dos CD8 no Grupo R (23.6 ± 6.9%) em relação ao Grupo II-R (38.0 ± 12.1%), o que os diferencia, igual e significativamente ( $p < 0.02$ ), das situações mais leves. Assim, a relação CD4/CD8 era mais elevada nos resistentes (1.8 ± 0.7), pelo que se afastava significativamente ( $p < 0.02$ ) do Grupo II-R (1.1 ± 0.7). Entretanto, as situações de resistência medicamentosa não pareceram exercer qualquer influência em relação às células  $\gamma/\delta$  (Fig. 26), as quais apresentavam, nos três Grupos aqui considerados,

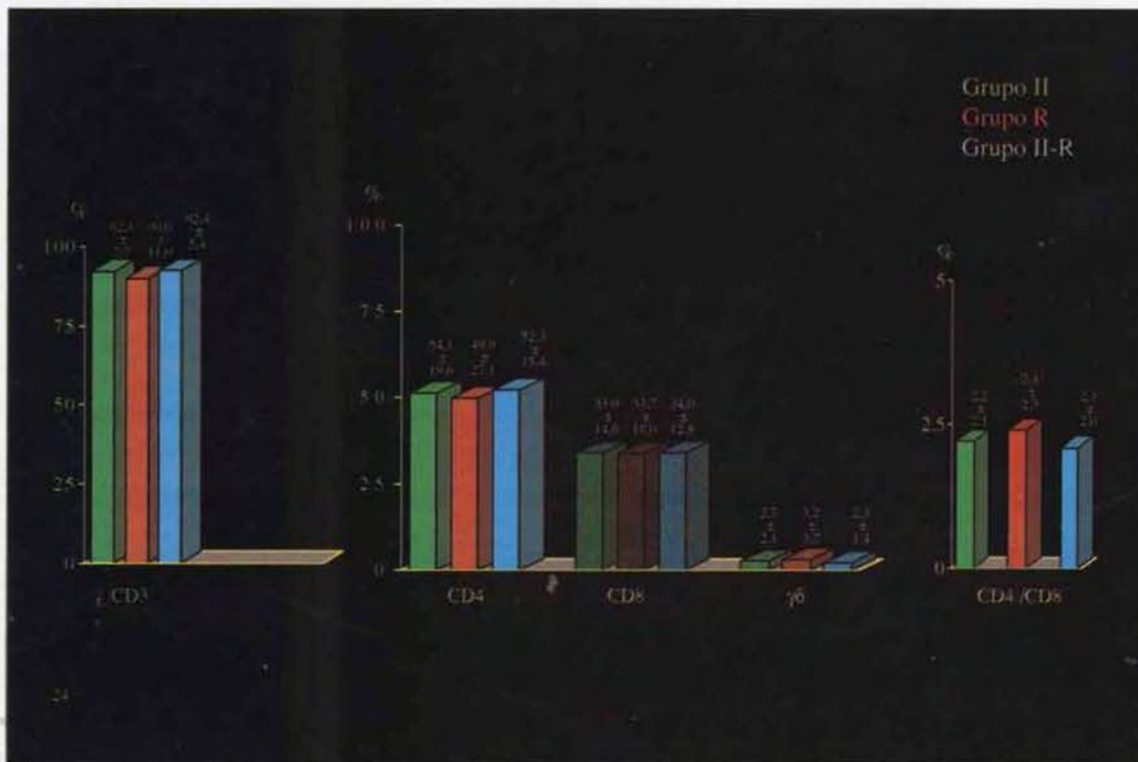


Fig. 24 – Populações e subpopulações linfocitárias do LLBA nos Grupos R, II-R e II

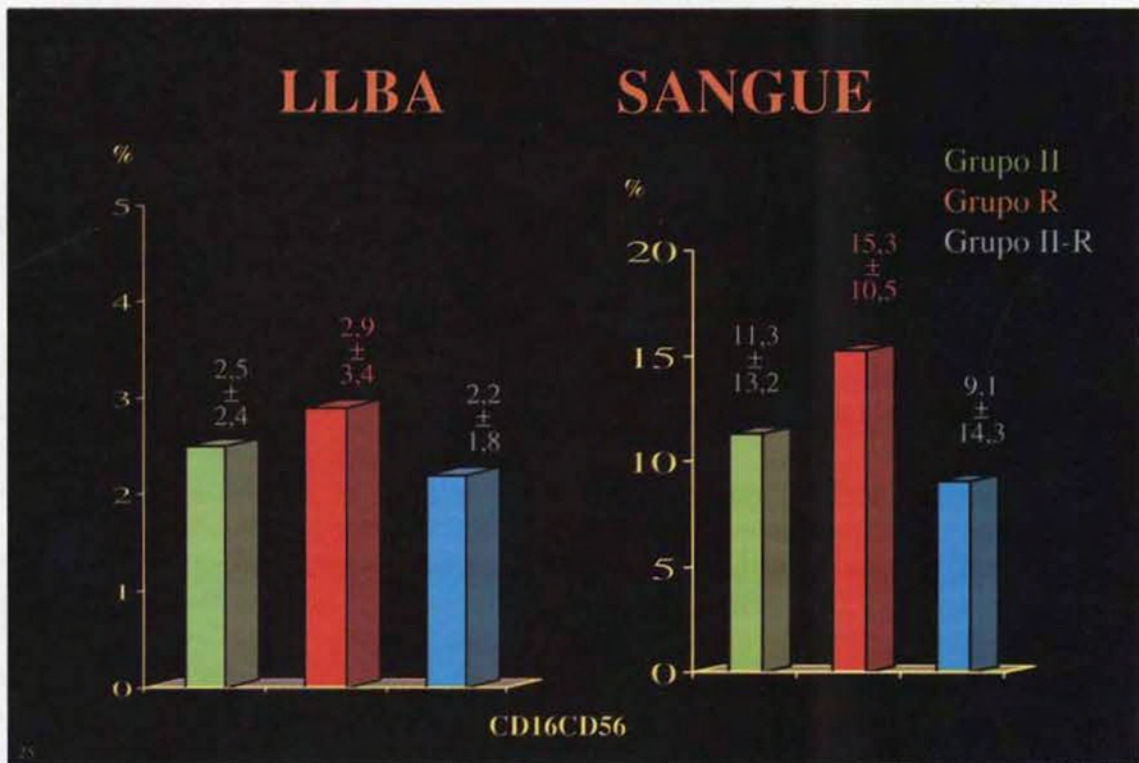


Fig. 25 – Atividade NK (CD16 CD56) no LLBA e no sangue periférico dos Grupos II-R, II e R

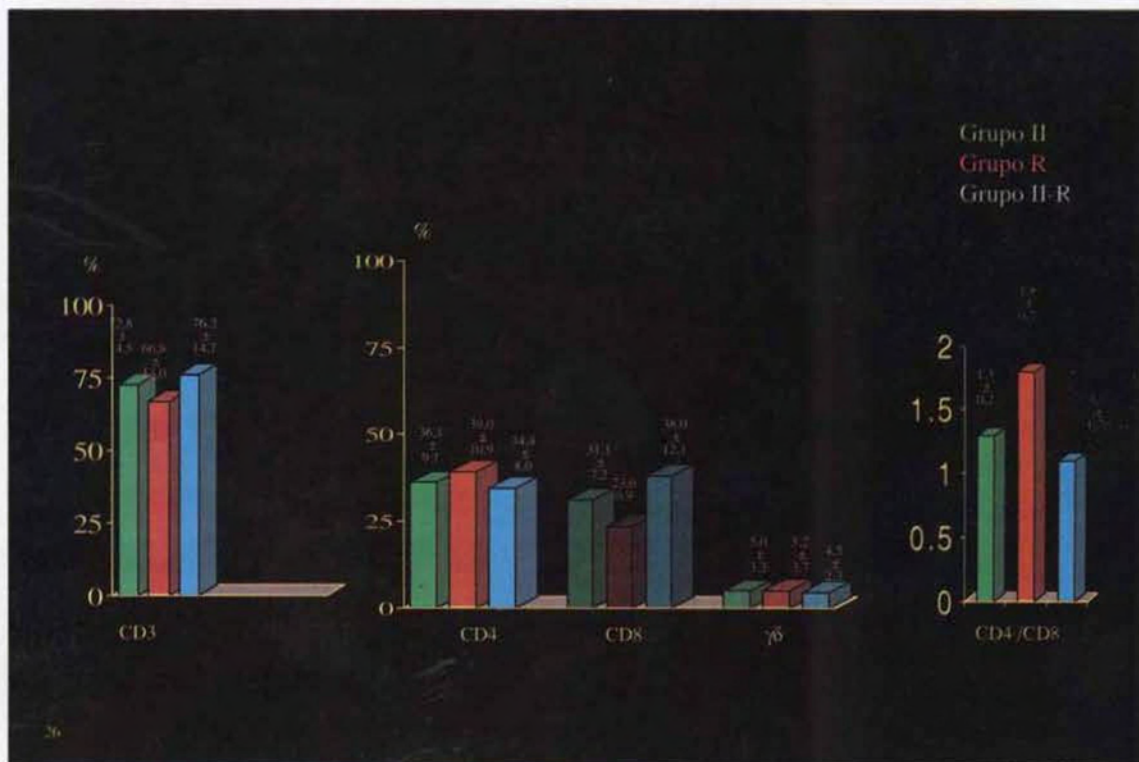


Fig. 26 – Populações e subpopulações linfocitárias no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

valores muito semelhantes ( $4.5 \pm 2.3\%$  /  $5.2 \pm 3.7\%$  /  $5.0 \pm 3.2\%$ ).

A actividade NK marcada pelo CD16 CD56 (Fig. 25) parecia aumentar paralelamente à gravidade da situação:  $8.9 \pm 7.7\%$  nas situações menos graves (Grupo I);  $9.1 \pm 14.3\%$  no Conjunto II-R;  $11.3 \pm 13.2\%$  no Grupo II; e  $15.3 \pm 10.5\%$  nas formas graves com resistência medicamentosa (Grupo R).

### Resposta Imunitária Humoral

A quantidade de linfócitos B no LLBA era muito reduzida (Fig. 27):  $0.4 \pm 0.4\%$  no Grupo R;  $1.0 \pm 1.1\%$  no Grupo II-R; e  $0.8 \pm 0.9\%$  no Grupo II.

No entanto, a sua evolução no sangue (Fig. 28) ocorria de uma forma semelhante à acima apontada para a actividade NK nesse meio biológico, embora com afastamentos muito ligeiros. Assim, pela mesma ordem, são os seguintes os seus valores:  $9.6 \pm 6.7\%$ ;  $9.9 \pm 7.6\%$ ; e  $10.6 \pm 9.7\%$ .

Quanto às imunoglobulinas (Fig. 29), apenas doseadas no sangue, só a IgM apresentava valores de acordo com as variações das células B:  $103.7 \pm 34.7$  mgr%;  $107.3 \pm 42.6$  mgr%;  $117 \pm 46.4$  mgr% e  $205.8 \pm 135$  mgr%. O teor mais elevado da IgA foi detectado no Grupo R ( $377 \pm 165.7$  mgr%), que assim se diferenciava do Grupo II-R ( $354.2 \pm 186.0$  mgr%) e da totalidade do Grupo II ( $372.3 \pm 182.6$  mgr%). Já a IgG aumentava de tal maneira entre os resistentes ( $1827 \pm 496.3$  mgr%) que lhe permitia diferenciar-se significativamente ( $p < 0.04$ ) dos restantes indivíduos que integravam o Grupo II ( $1383 \pm 288.3$  mgr%), ao qual, na sua globalidade, correspondia o valor de  $1517 \pm 416.7$  mgr%.

Pelo que diz respeito ao Complemento, a sua fracção C3 (Fig. 30) aumentava moderada mas significativamente ( $p < 0.02$ ) nos resistentes ( $197.2 \pm 34.5$  mgr%), por oposição aos restantes doentes – Grupo II-R ( $170.9 \pm 27.9$  mgr%) – o que conduzia aos valores de  $181.9 \pm 32$  mgr% para o Grupo II. Entretanto, a fracção C4 (Fig. 30) exibia níveis normais e muito

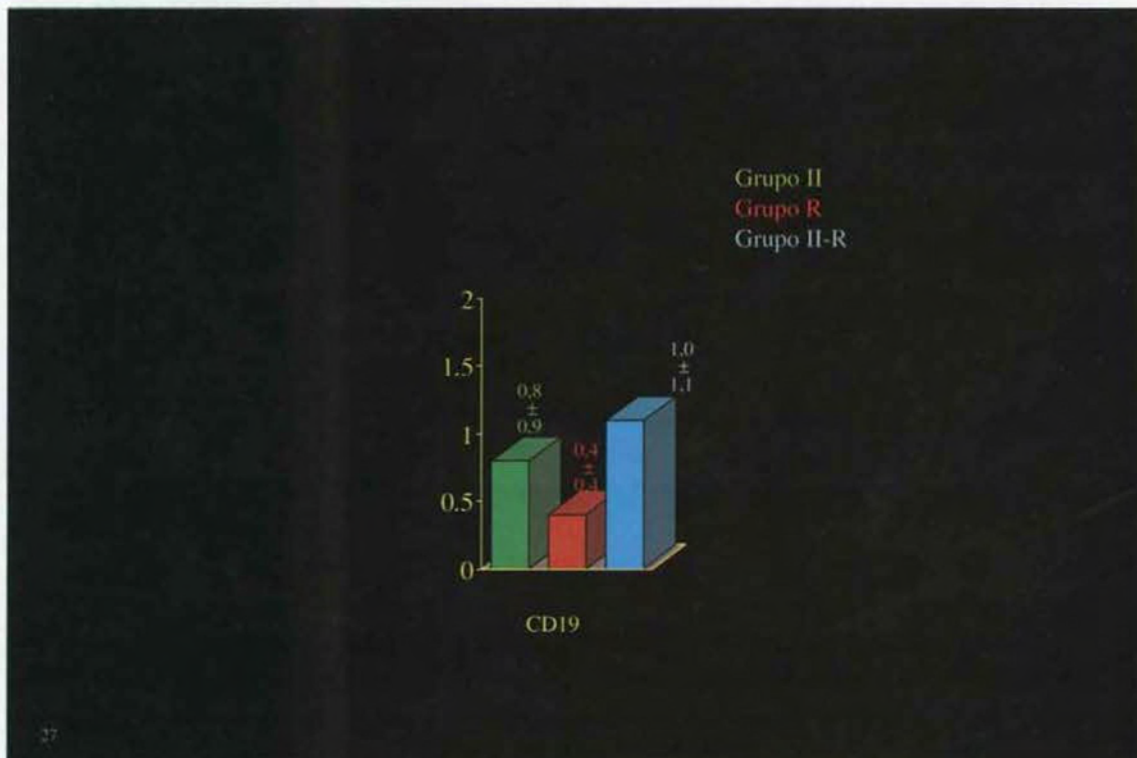


Fig. 27 – População linfocitária B no LLBA dos Grupos R, II-R e II



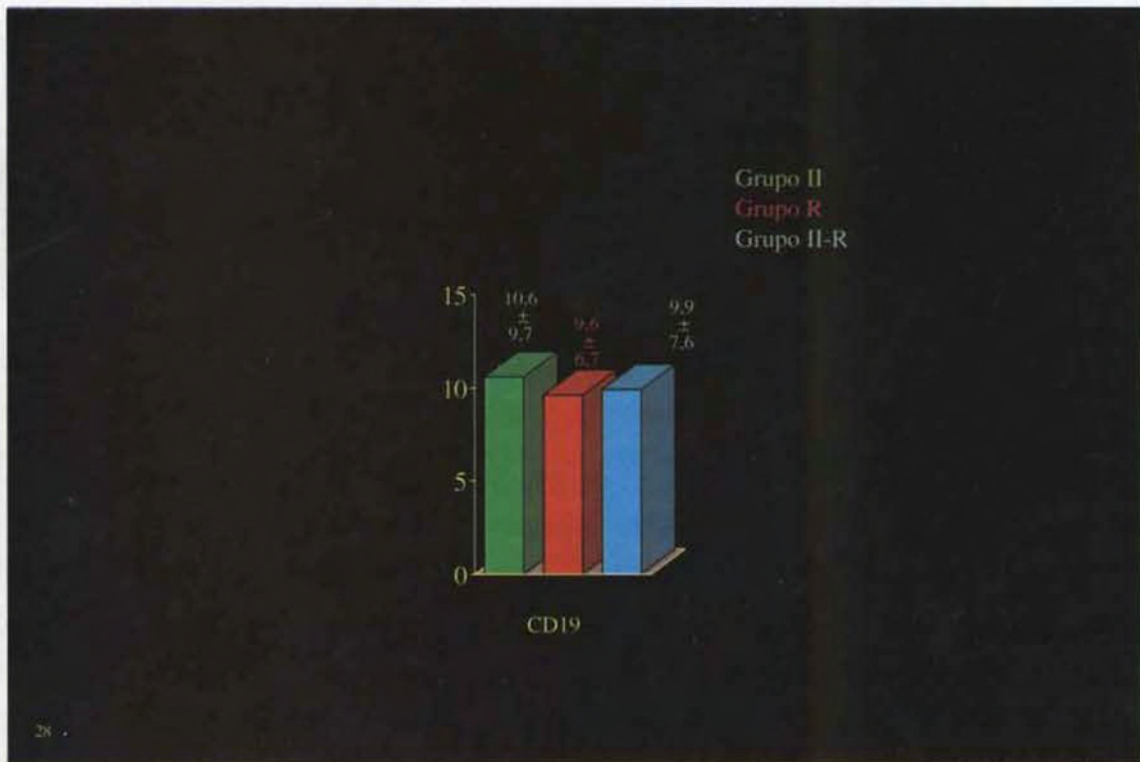


Fig. 28 – População linfocitária B no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

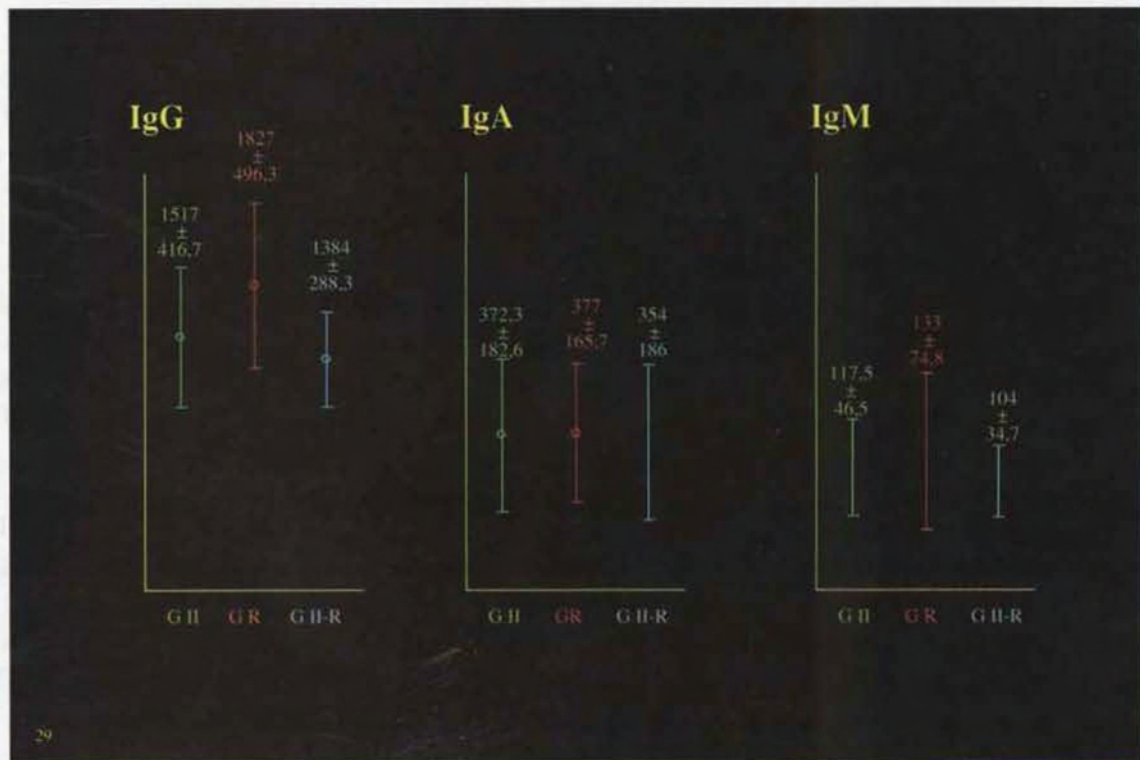


Fig. 29 – Imunoglobulinas G, A e M no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

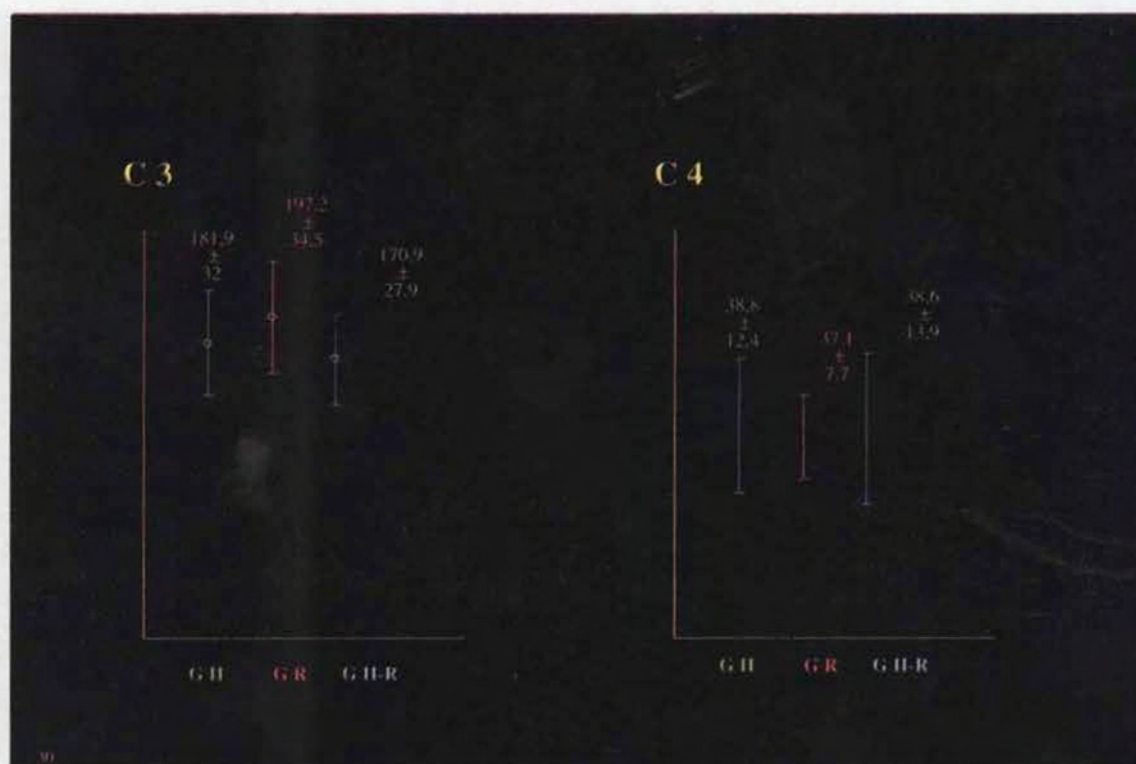


Fig. 30 – Fracções C3 e C4 do Complemento no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

próximos nos três conjuntos:  $37.1 \pm 7.7$  mgr% no Grupo R;  $38.6 \pm 13.9$  mgr% no Grupo II-R; e  $38.8 \pm 12.4$  mgr% no Grupo II.

A  $\alpha$ -1-antitripsina (Fig. 31) apresentava-se moderadamente elevada, mas com valores semelhantes, nos três conjuntos: Grupo R ( $242.7 \pm 101.1$  mgr%); Grupo II-R ( $245.8 \pm 100.1$  mgr%); e Grupo II ( $253.5 \pm 99.7$  mgr%).

#### Perfis Linfocitários Th1/Th2 – Celulares e Citocínicos

O fenómeno da resistência medicamentosa não pareceu influenciar os perfis Th1/Th2, tanto pelo que diz respeito aos fenótipos linfocitários, como ao respectivo ambiente citocínico, a nível das áreas lesadas. Com efeito, em relação aos Grupos R, II-R e II, os valores dos elementos celulares (Fig. 32) ( $23.4 \pm 11.8\%$ / $24.7 \pm 8.8\%$ / $24.3 \pm 9.7\%$  para os Th1 e

$26.4 \pm 16.5\%$ / $27.6 \pm 8.7\%$ / $27.2 \pm 11.6\%$  para os Th2) e das citocinas (Fig. 33) ( $7.8 \pm 2.5\%$ / $7.6 \pm 2.6\%$ / $7.3 \pm 1.8\%$  para o  $\gamma$ -INF;  $10.9 \pm 1.2\%$ / $9.8 \pm 1.2\%$ / $10.3 \pm 1.3\%$  para a IL<sub>4</sub>; e  $2.3 \pm 0.5\%$ / $1.8 \pm 0.7\%$ / $1.3 \pm 1.0\%$  para o  $\gamma$ -INF + IL<sub>4</sub>) apresentavam-se muito aproximados.

Já no sangue, embora sem diferenças estatisticamente significativas, parecia existir uma ligeira elevação dos Th1 (Fig. 34) e uma pequena queda do número de Th2 entre os resistentes ( $32.9 \pm 10.3\%$ / $25.9 \pm 8.1\%$ / $28.4 \pm 9.3\%$  para os Th1 e  $6.2 \pm 3.9\%$ / $8.3 \pm 4.1\%$ / $7.6 \pm 4.1\%$  para os Th2), o que não se verificou em relação às citocinas (Fig. 35) ( $19.0 \pm 2.7\%$ / $18.3 \pm 2.6\%$ / $17.6 \pm 2.4\%$  para o  $\gamma$ -INF;  $8.7 \pm 2.0\%$ / $8.7 \pm 2.4\%$ / $8.6 \pm 2.7\%$  para a IL<sub>4</sub>; e  $3.4 \pm 0.8\%$ / $3.2 \pm 0.8\%$ / $2.9 \pm 0.9\%$  para o  $\gamma$ -INF + IL<sub>4</sub>).

Assim, nas regiões pulmonares atingidas relativas às formas mais graves, as células linfocitárias Th2 e a citocina IL<sub>4</sub> continuavam a predominar sobre as Th1 e o  $\gamma$ -INF, independentemente de os doentes apresentarem ou não resistência à medicação, atestando a

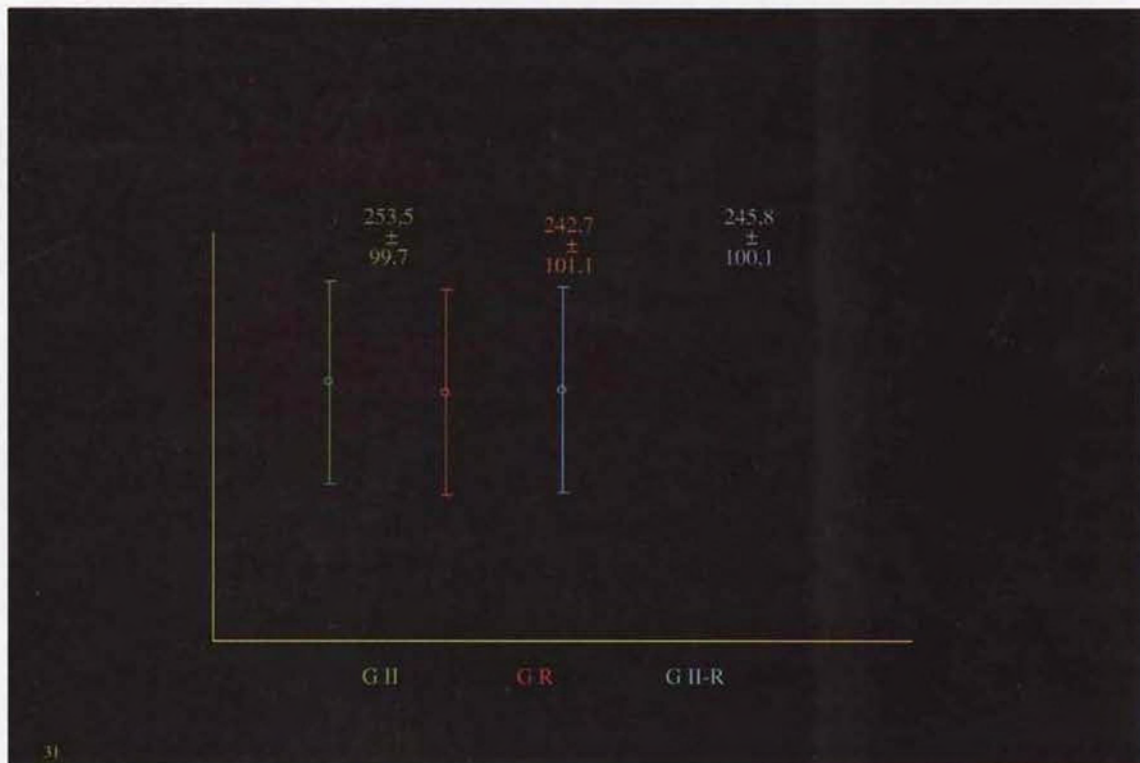


Fig. 31 - α-1-Antitripsina no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

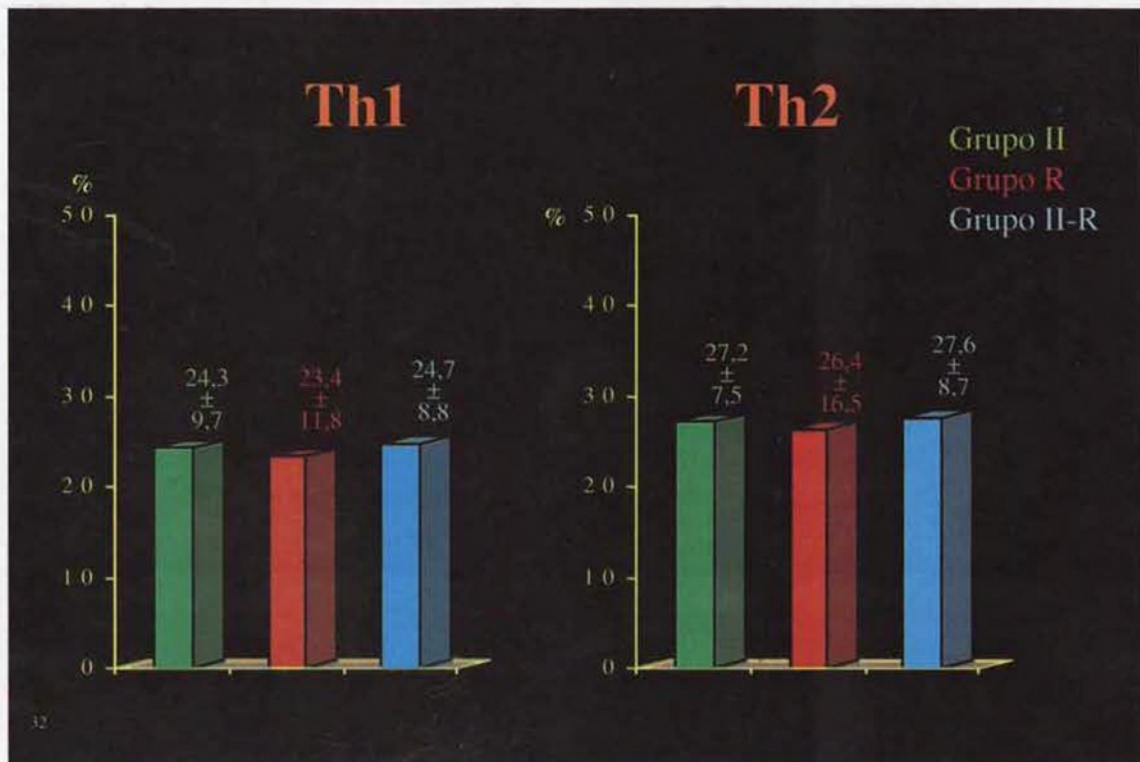


Fig. 32 - Fenótipos linfocitários Th1/Th2 do LLBA nos Grupos R, II-R e II

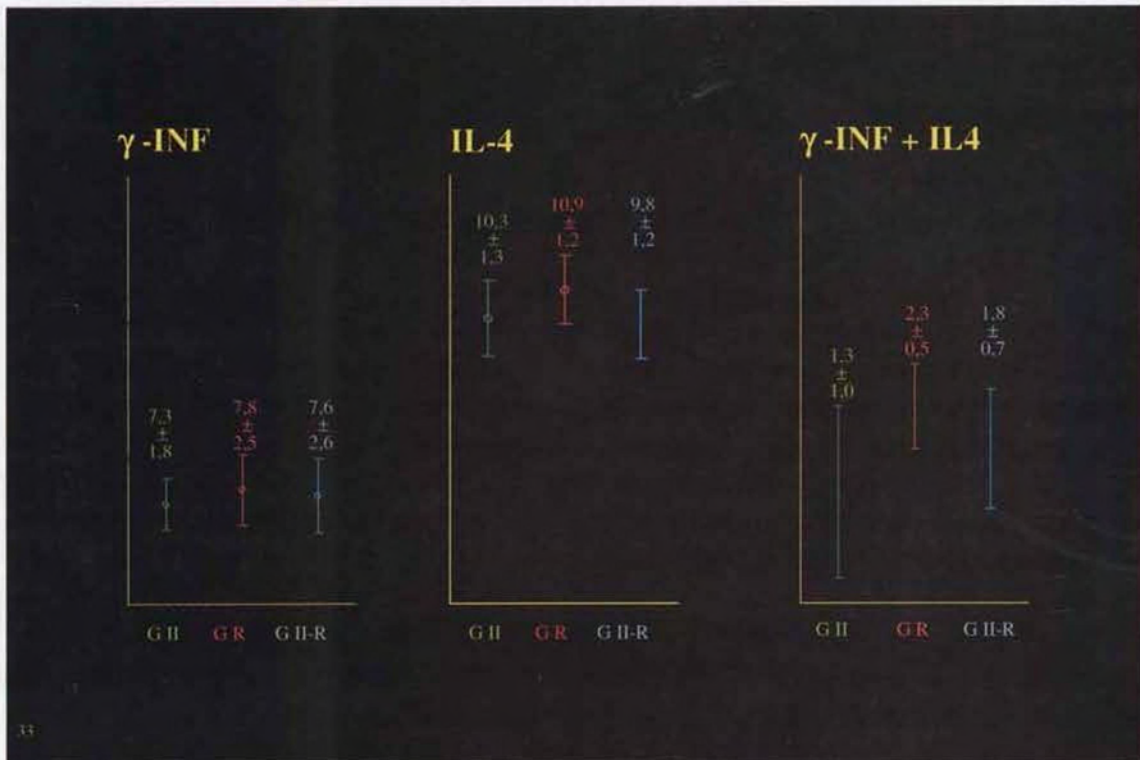


Fig. 33 –  $\gamma$ -INF e IL-4 do LLBA nos Grupos R, II-R e II

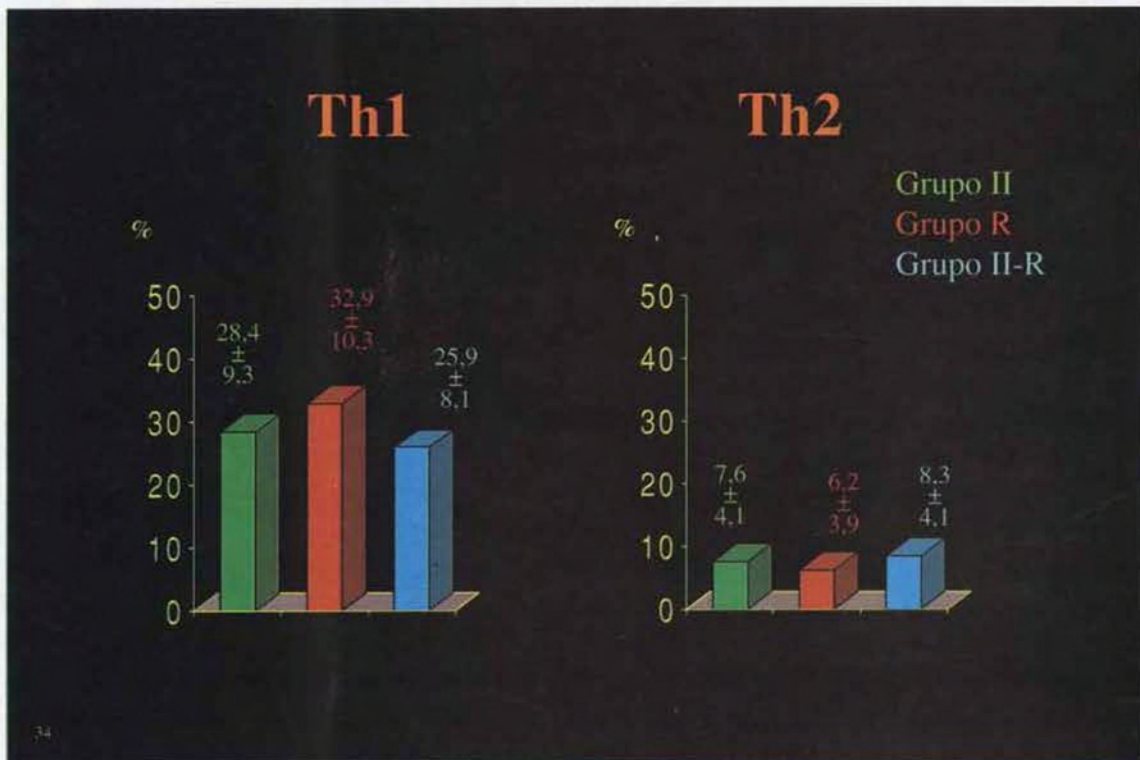


Fig. 34 – Fenótipos linfocitários Th1/Th2 no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

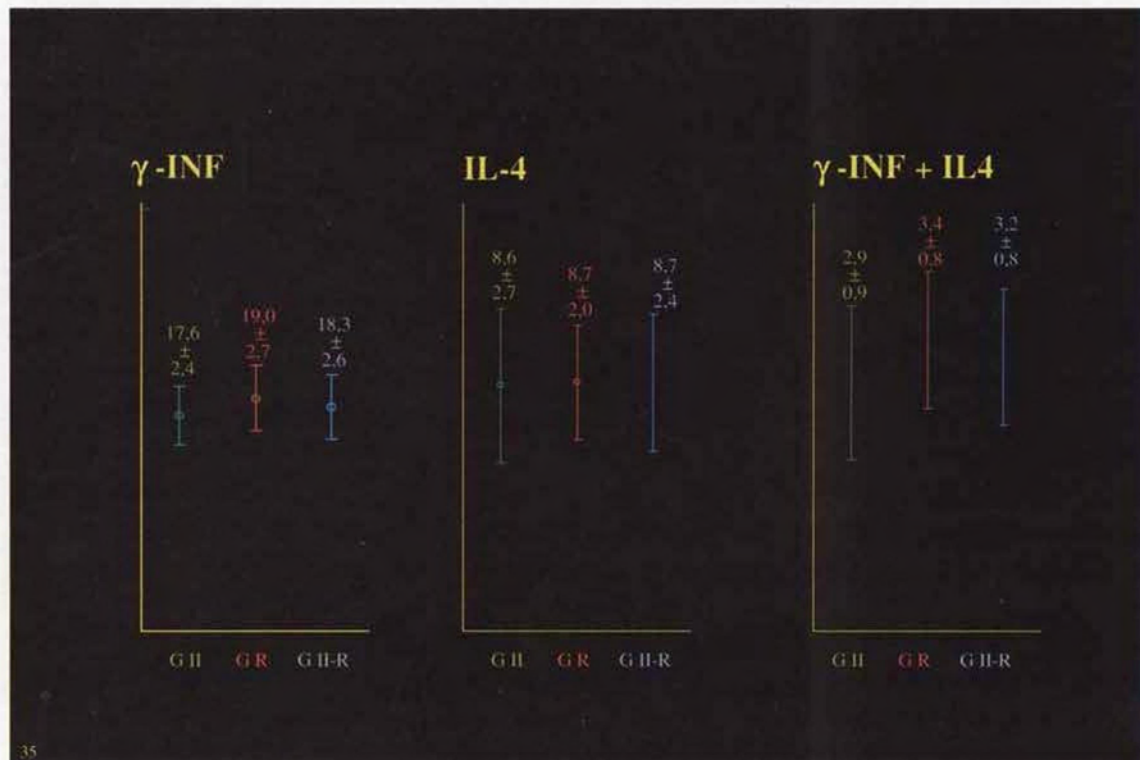


Fig. 35 –  $\gamma$ -INF e IL-4 no sangue periférico dos Grupos R, II-R e II

gravidade da situação clínica, o que não acontecia no sangue periférico, onde o perfil Th1, celular e citocínico, permanecia largamente dominante.

#### Auto-Fluorescência dos Macrófagos Alveolares

Paralelamente, os macrófagos alveolares dos indivíduos com resistência medicamentosa, embora continuassem a revelar uma significativa diminuição da sua capacidade funcional, não constituíam, entre as formas graves, o conjunto mais atingido (Fig. 36). Antes pelo contrário, a sua auto-fluorescência, particularmente nas determinações efectuadas acima dos 100 canais ( $51.5 \pm 15.1\% > 1000$  canais;  $16.6 \pm 13.9\% > 100$  canais;  $0.6 \pm 1.0\% > 10$  canais), apresentava-se superior à dos restantes doentes (Grupo II-R) ( $44.3 \pm 17.2\% > 1000$  canais;  $3.7 \pm 6.0\% > 100$  canais;  $0.0 \pm 0.1\% > 10$  canais) e à globalidade do Grupo II ( $46.2 \pm 16.8\%$ ;  $6.0 \pm 7.2\%$ ;  $0.2 \pm 0.6\%$ ).

#### DISCUSSÃO

Na infecção primária, os *Mycobacterium tuberculosis* (MTs) inalados que ultrapassam a barreira oposta à sua progressão pelo tapete muco-ciliar alojam-se no pulmão profundo, habitualmente nas áreas subpleurais, dando origem a um infiltrado que atinge a região intersticial, os vasos sanguíneos e as paredes brônquicas, onde os bacilos se multiplicam livremente.

A lesão assim constituída, na qual a expansão bacilar é frenada pelo macrófago alveolar, auto-limita-se em cerca de 90% dos casos. É, no entanto, a partir dos bacilos quiescentes que permanecem no interior dos macrófagos ou do tecido cicatricial resultante dessa agressão que, mais tardiamente, se desencadeia a tuberculose de reinfeccção (9).

#### Resistência Inespecífica

A primeira linha de defesa face à actividade destes

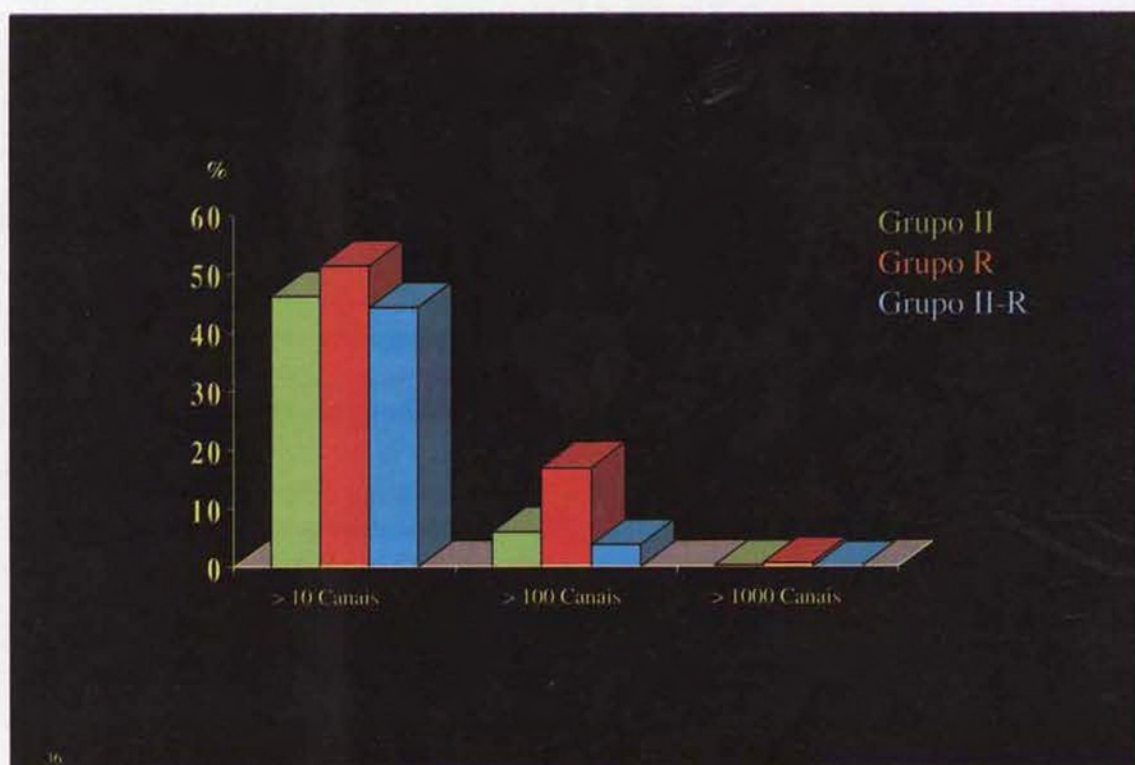


Fig. 36 – Auto-fluorescência dos macrófagos alveolares recolhidos por LBA nos Grupos R, II-R e II

MTs que atingem o pulmão profundo e aí se multiplicam, intra ou extra-celularmente, está ligada a fenómenos de resistência natural, inespecífica e independente da intervenção imunitária, admitindo-se que seja determinada por um gene autossómico e dominante (10).

No contexto da resistência à infecção tuberculosa, o macrófago alveolar representa, desde esta fase inicial, a *placa giratória* da qual depende a maioria dos fenómenos que em cascata se virão a desencadear a partir do momento em que se processa a sua activação, na sequência da fagocitose dos MTs ou dos respectivos componentes, que no seu conjunto assumem uma expressão antigénica particularmente complexa (proteínas da parede e da membrana, isoladas ou em combinação com estruturas lipídicas e polissacarídeas, e as *proteínas de exportação*, vertidas no ambiente celular após síntese intra-citoplasmática, as quais representam uma importante fonte de estimulação imunogénica), até à morte intracelular dos bacilos, passando por uma importante interligação aos restan-

tes elementos celulares presentes no pulmão profundo (10).

Recorde-se, entretanto, que durante todo o curso da infecção o macrófago alveolar continuará a ser estimulado, por via indirecta, através das citocinas das células T-CD4 especificamente activadas por antígenos peptídeos (11).

No âmbito dos mecanismos de defesa inespecífica outros elementos parecem assumir um papel de particular importância. Trata-se das células com actividade NK, face à sua capacidade de síntese do  $\gamma$ -INF, o qual, aliás, irá ser decisivo na fase imediatamente seguinte, ao promover a diferenciação do fenótipo linfocitário Th1 (10). De facto, nos resultados que obtivemos é possível reconhecer, no LLBA, uma correlação significativa ( $p < 0.04$ ) entre a actividade NK marcada pelas células CD 16 CD56 e a taxa de Th1 (Fig. 37). Esta actividade encontra-se aparentemente dependente da IL-12 sintetizada pelas células macrófágicas, já que, no animal, foi demonstrado que

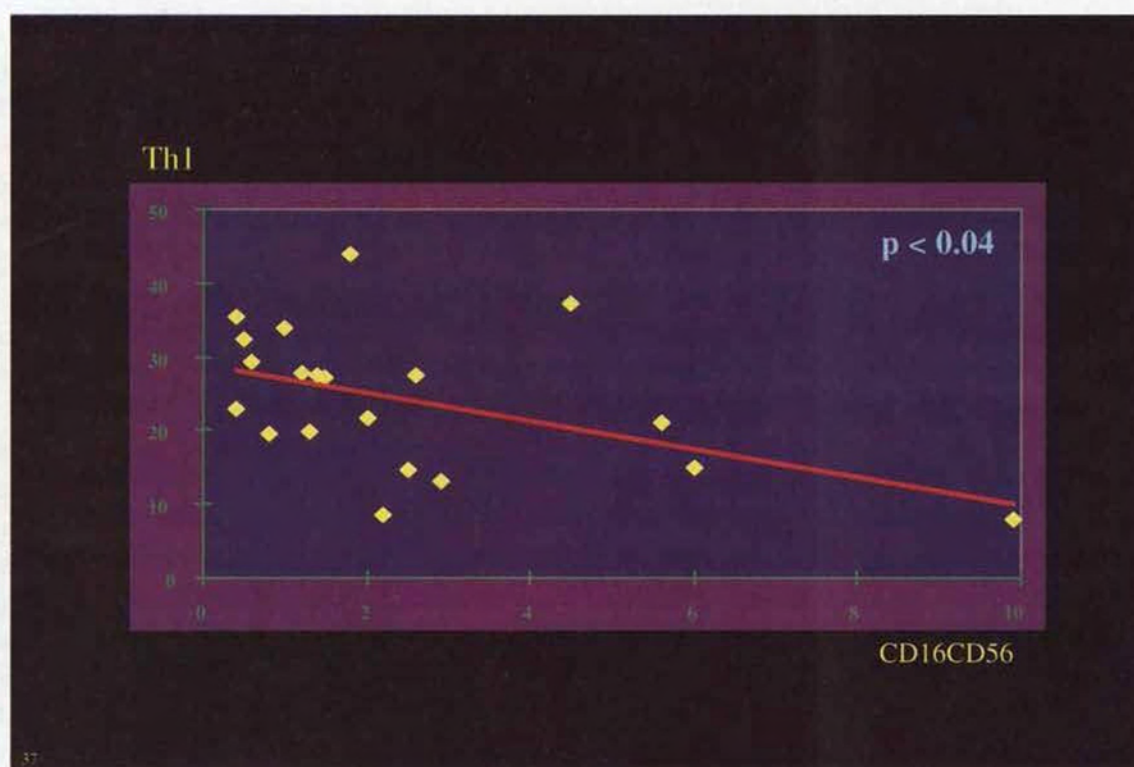


Fig. 37 – Correlação entre a actividade NK (CD16 CD56) e a taxa de linfócitos Th1 no LLBA

a depleção das células NK, ou a inibição da IL-12 pelas citocinas IL-10 e IL-4, desencadeia uma diferenciação linfocitária exclusivamente Th2 e uma diminuição da expressão  $\gamma$ -INF (12,13,14,15). A importância da intervenção da IL12 na activação dos Th1 é demonstrada pela existência de uma relação dose/dependência neste fenómeno.

### Resistência Específica

Na sequência da fase inicial, inespecífica, habitualmente curta e caracterizada por sucessivos fenómenos de necrose, surge a resistência específica, esta de natureza imunitária, intimamente ligada ao eixo macrofágico-linfocitário.

Diversos argumentos atestam a importância assumida por estes elementos celulares na resistência específica à infecção pelo MT, sucintamente assim expressa (10):

- O macrófago alveolar, na fagocitose e destruição das micobactérias e no papel de *placa giratória* da maioria dos fenómenos imunológicos que ocorrem neste processo.
- As populações linfocitárias T-CD4, CD8 e  $\gamma/\delta$ , na ampliação da resposta imune, com o concurso de citocinas, e na lise das células alvo, particularmente dos macrófagos infectados, através de uma actividade citotóxica.

A decisiva influência destas populações na evolução da infecção tuberculosa encontra-se seguramente averiguada, como resultado da extensa investigação que nestes domínios foi efectuada e de cujos resultados se destacam os seguintes elementos:

Em relação às células T-CD4

- Correlação entre a sua reactividade e a extensão das lesões.
- Reactivação de MTs quiescentes e agravamento das lesões tuberculosas na infecção VIH, a qual

- cursa, como se sabe, com baixos níveis de CD4.
- Associação destes elementos celulares a elevados teores de  $\gamma$ -INF e de IL-12.
- Presença de diminutas taxas destes linfócitos nas áreas necróticas, em contraste com a sua elevada concentração nas formações epitelióides.
- Actividade citotóxica/citolítica adstrita aos linfócitos T-CD4 reactivos ao MT perfeitamente demonstrada.

Em relação às células T-CD8

- Activação específica destes linfócitos na infecção tuberculosa.
- Capacidade reconhecida a estas células para destruir os elementos celulares infectados pelo MT.
- Importante produção da  $\gamma$ -INF e de IL-4 neste contexto.
- Provável envolvimento nas relações Th1/Th2 desde a fase inicial da infecção.

Em relação às células T -  $\gamma/\delta$

- Vigorosa resposta destes linfócitos face ao PPD.
- Acumulação destes elementos celulares em diversas circunstâncias: nos pulmões expostos a aerossóis de PPD; nos gânglios linfáticos depois da imunização com MTs; na cavidade peritoneal após infecção com BCG; nas áreas necróticas das linfadenites tuberculosas.
- Aumento destes linfócitos no sangue periférico, selectivamente induzido pelo MT.
- Promoção da lise dos macrófagos infectados com Mts.
- Participação na granulomatogénese, através da secreção de citocinas.
- Resposta, não específica, ao factor Corda.

### ***Influência da Resposta Imunitária do Pulmão Profundo no Espectro Clínico da Tuberculose***

À semelhança do que ocorreu noutros quadros patológicos, também a TP viria a ser alvo de um notável impulso no âmbito da interpretação dos mecanismos patogénicos que comandam o seu espec-

tro clínico com a aplicação da LBA. Na verdade, este método, ao permitir-nos estudar, no próprio local das lesões, a celularidade, diversos aspectos da imunidade celular e humoral e variados parâmetros bioquímicos, tem contribuído decisivamente para o conhecimento que hoje se possui desta afecção e, muito particularmente, de algumas modificações que surgiram nos últimos tempos (17,18).

Ainda neste contexto, a possibilidade de repetição do exame no decurso da doença permite-nos apreciar os acontecimentos íntimos que ocorrem durante a sua evolução e as variações sofridas pelos diversos parâmetros neles implicados. Assim, por exemplo, a cinética das populações linfocitárias T, acompanhadas pelos respectivos padrões citocínicos presentes no pulmão profundo durante a TB, variam ao longo do tempo e correlacionam-se com o tipo e a importância da lesão tecidual: na fase aguda, inicial, predominam as células T-CD4, particularmente o fenótipo Th1, atestado pela presença de células IL-2 positivas e de um notável aumento de  $\gamma$ -INF m RNA; já na fase crónica, assiste-se a uma elevação dos linfócitos T-CD8, acompanhados de um perfil Th0, face à equivalente detecção de IL-2 e IL-4 nas lesões pulmonares, coincidentemente com elevados níveis de  $\gamma$ -INF e de IL-4 m RNA; quanto às células T- $\gamma/\delta$ , foi possível constatar que a sua presença se manifesta pela ocorrência de dois *picos* - um na fase inicial, pelo terceiro dia, e outro na fase crónica, pelos quatro meses.

Por isso, alguns autores julgam ser possível prever a gravidade da situação tuberculosa através da distribuição percentual dos diferentes elementos celulares que integram o LLBA, a qual seria benéfica quando ocorre uma elevação linfocitária e mais grave quando se assiste a um aumento do número de fagócitos. Pessoalmente, não perfilhamos esta opinião, na medida em que, independentemente da quantidade total de células linfocitárias presentes no LLBA, serão as respectivas subpopulações que irão determinar a diversidade da evolução clínica. Aliás, os nossos resultados permitiram-nos constatar que eram precisamente as formas mais graves que continham, no



pulmão profundo, um maior número de linfócitos CD4, mas à custa do seu fenótipo Th2, o que acarretava uma diminuição da resistência face à agressão micobacteriana.

#### *Avaliação do Tipo e Extensão da Alveolite*

A análise dos resultados obtidos neste estudo permite-nos constatar que a infecção tuberculosa desencadeou no pulmão profundo, como seria de aguardar, um moderado processo inflamatório que se traduzia pela presença de uma alveolite, particularmente nas situações clínicas mais delicadas.

No entanto, a gravidade desta infecção não se relacionava apenas com a intensidade das alterações inflamatórias, mas igualmente com a distribuição percentual dos diferentes tipos celulares que integravam o LLBA. Com efeito, a alveolite das formas clinicamente mais leves apresentava um predomínio de células fagocitárias, enquanto que nas mais graves se acentuava a elevação do número de linfócitos e de polimorfonucleares neutrófilos.

Assim, à medida que a situação clínica se agravava diminuía, nas áreas lesadas, a quantidade de macrófagos e a alveolite assumia características nitidamente linfocíticas.

#### *Avaliação da Resposta Imunitária*

O estudo das populações e subpopulações linfocitárias T (CD3, CD4, CD8,  $\gamma/\delta$  e CD16 CD56) não revelou, neste conjunto de indivíduos, a presença de desvios significativos. De assinalar, apenas, uma aparentemente benéfica elevação da percentagem de células CD4 e, por via disso, um aumento da relação CD4/CD8 no LLBA, correspondente às situações mais graves, ao contrário do que se verificava no sangue periférico, onde estes elementos celulares predominavam, embora ligeiramente, nas formas mais leves.

No entanto, se parecia incontroversa uma maior atracção às regiões pulmonares mais gravemente

lesadas de um acrescido número de linfócitos T-CD4, a verdade é que os linfócitos T- $\gamma/\delta$  e a actividade NK se encontravam levemente diminuídas nas áreas patologicamente envolvidas, de acordo com a evolução da situação.

Dir-se-ia assim que, no órgão lesado, a atestar a gravidade das lesões se encontrava a queda local das células T- $\gamma/\delta$  e NK e que a marca representativa da capacidade reactiva do organismo se exprimia através da elevação, nessas áreas, dos linfócitos TCD4.

As defesas imunitárias que ocorrem à infecção tuberculosa são de mediação celular, não se reconhecendo à imunidade humoral uma participação relevante nestes fenómenos, o que está de acordo com os resultados que obtivemos nestes domínios. De facto, a população linfocitária B, sempre em valores muito superiores no sangue periférico, repartiu-se uniformemente pelos dois grupos estudados, tanto nesse meio biológico como no LLBA. Quanto às imunoglobulinas séricas, embora se assistisse a uma elevação dos valores da IgA, as diferenças entre os dois conjuntos eram tão diminutas que julgamos não lhes dever atribuir qualquer significado no contexto da diferenciação da situação clínica. Mas alguns autores referem que, para além de um aumento da IgM nas fases iniciais da doença, pode ocorrer uma elevação do teor de IgA, aliás com o de IgE, no decurso da evolução da infecção, apenas nas situações clinicamente graves, nas quais se reconhece um compromisso da imunidade retardada. Em relação à IgE não nos repugna aceitar que os seus níveis se encontrem ligados à gravidade da situação clínica. SHIRAKAWA (19), entre outros, tem chamado a atenção para a existência de uma relação inversa, mas significativa, entre a hipersensibilidade ao MT e a atopia, traduzida na observação de reacções positivas à tuberculina na generalidade dos indivíduos com diminuta incidência de asma e com baixos níveis de IgE. Nas formas graves de TP, uma acrescida síntese de IgE estaria, quanto a nós, ligada a uma maior produção de IL-5, a qual representa o mais importante factor envolvido na activação eosinofílica, dado que a sua síntese é induzida pela IL-2, cujo nível

é localmente proporcional à intensidade do componente inflamatório.

O espectro de gravidade clínica da TP resultará sempre da luta que se estabelece entre o agente infectante e a capacidade defensiva do organismo.

Ora, em relação ao conjunto dos casos que integravam este estudo, não nos pareceu que os bacilos que atingiram esses doentes manifestassem uma maior agressividade. Aliás, a análise dos resultados permitiu-nos constatar que mesmo os indivíduos portadores de resistência medicamentosa, embora integrados no conjunto de situações clínicas mais graves, não se afastavam, neste contexto, dos restantes indivíduos desse grupo e, portanto, este fenómeno não parecia justificar, só por si, a gravidade clínica que afectava esses elementos.

Por outro lado, os parâmetros classicamente utilizados para marcar o estudo da imunidade celular, tanto no departamento sistémico, como localmente, através da LBA, não permitiram diferenciar a gravidade das situações clínicas em análise. Nestas circunstâncias, face a um esquema que integre os diversos factores e as relações entre si estabelecidas, apontados como relevantes nos mecanismos patogénicos da TB., dir-se-ia que os resultados até agora apreciados não forneceram indicações susceptíveis de poderem diferenciar, e assim explicar, a razão pela qual indivíduos aparentemente imunocompetentes reagem de forma tão diversa ao mesmo agente infeccioso. Na verdade, não parece que as pequenas diferenças detectadas no pulmão profundo destes tuberculosos, em relação à percentagem de células CD3, CD4, CD8,  $\gamma/\delta$  e NK, possam definir um perfil imunológico adstrito a uma expressão clínica tão acentuadamente grave como aquela que correspondia aos indivíduos que integravam o Grupo II.

#### ***Importância dos Perfis Th1/Th2 no Espectro de Gravidade da Tuberculose***

Foi neste contexto que decidimos aplicar a este

conjunto de doentes a metodologia que nos permitiu estudar, noutra projecto de investigação (20), as variações dos fenótipos linfocitários CD4 – Th1 e Th2 – e a sua influência no espectro de gravidade destas situações clínicas, modeladas pelo microambiente citocínico presente nas respectivas lesões. Com efeito, o relato de outros grupos de trabalho (21,22,23,24, 25, 26,27,28,29,30) que igualmente se dedicam a este tema, mas também a perspectiva de que, à semelhança do que detectámos na infecção VIH (20), os linfócitos Th1 se encontrassem envolvidos nos fenómenos de resistência imunitária celular e os Th2 mais adstritos à susceptibilidade à infecção e aos mecanismos de imunidade humoral, nomeadamente à diferenciação linfocitária B e à anticorpo-génese, pareciam apontar nesse sentido. Esta hipótese seria reforçada pelo facto de se ter demonstrado que noutra micobacteriose, a lepra, um perfil Th1 se encontra presente na forma tuberculóide enquanto que a forma lepromatosa cursa com um predomínio de Th2 (22,29).

E, de facto, pudemos constatar que as situações clinicamente menos graves se expressavam por um predomínio de Th1 no microambiente lesional e as mais graves por um elevado número de Th2, ao contrário do que sucedia no sangue periférico, onde a percentagem de Th1 ultrapassava sempre e largamente a de Th2, independentemente da gravidade do quadro clínico. Também LIN (30) pôde observar, nas lesões muito extensas da lepra, um excesso de Th2, os quais se encontravam ausentes no sangue periférico.

Ora, a importância desta cinética linfocitária no pulmão profundo reside no ambiente citocínico que acompanha cada um destes perfis, do qual resulta uma maior ou menor capacidade defensiva frente ao agente infeccioso. Por isso, as manifestações clínicas dos nossos doentes dependiam, entre outros factores, das citocinas ligadas ao predomínio de Th1 ou de Th2. Na verdade, uma maior quantidade de  $\gamma$ -INF, adstricta ao perfil Th1, e o seu papel imunorregulador, pareciam conferir uma maior resistência à infecção tuberculosa, enquanto que nas formas graves, onde a citocina mais abundante era a IL-4, correspondente a um perfil Th2, os doentes se revelavam mais susceptíveis.

Aliás, a análise dos resultados que obtivemos no âmbito deste estudo, permitiu verificar que as células Th1 se correlacionavam significativamente ( $p < 0.005$ ) e positivamente com o  $\gamma$ -INF (Fig. 38) e igualmente significativamente ( $p = 0.0001$ ), mas agora negativamente, com a IL-4 (Fig. 39). Não admira, portanto, que as variações em sentido oposto do  $\gamma$ -INF e da IL-4 (Fig. 40) apresentassem, igualmente, uma correlação muito significativa ( $p < 6.4 \times 10^{-5}$ ).

Para DEL PRETE (21), estas situações individuais seriam irreversíveis, dado que os perfis Th1/Th2 se estabilizam uma vez instituídos, e as próprias células T, nestas circunstâncias, expandem preferencialmente subpopulações produtoras de citocinas igualmente definidas e estabilizadas, das quais dependem as manifestações clínico-radiológicas.

Vários autores, como GRANGE (23), atribuem uma importância decisiva, neste contexto, ao contacto primário da micobactéria com o microambiente citocínico tecidual, do qual depende a via de matura-

ção predominante das células T. De facto, PEARLMAN (31) pôde verificar, *in vitro*, que a exposição de células T de um indivíduo infectado pelo MT ao PPD desencadeia uma resposta Th1 com níveis de  $\gamma$ -INF muito superiores aos IL-4, mas se essa exposição se efectuar com células de um doente igualmente atingido por filaríase que, como se sabe, é responsável por um ambiente citocínico Th2, a reacção ao PPD já se acompanha por um predomínio de IL-4 e IL-5. Assim, o ambiente citocínico criado pela filaríase modelava a resposta Th1 aos antígenos micobacterianos por mecanismos aparentemente dependentes da IL-4, dado que essa reacção seria diminuída pela neutralização desta citocina. No entanto, ORME (32) viria a reconhecer, através de estudos conduzidos em ratos, que a cinética de emergência dos perfis citocínicos nos processos imunitários face à infecção tuberculosa se inicia pelo  $\gamma$ -INF e só vinte a quarenta dias depois se detecta a presença de IL-4.

Na fase inicial desta diferenciação, a IL-12, cuja

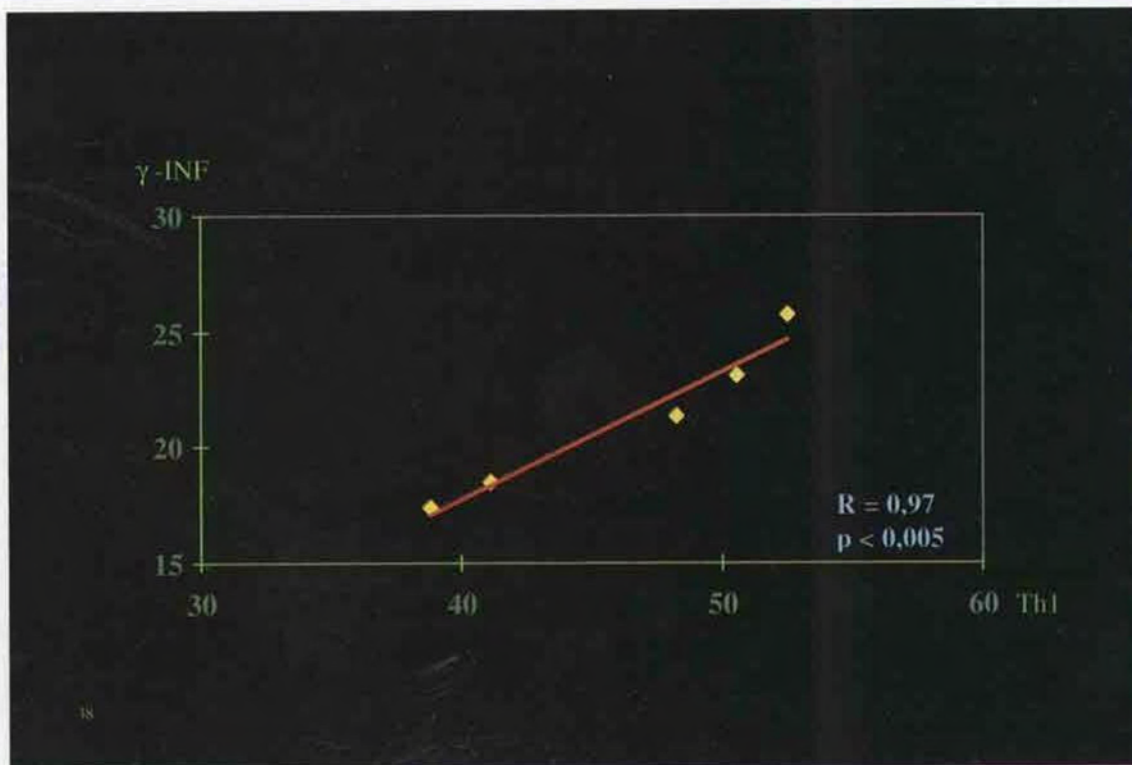


Fig. 38 – Correlação, no LLBA, entre o fenótipo linfocitário Th1 e o  $\gamma$ -INF

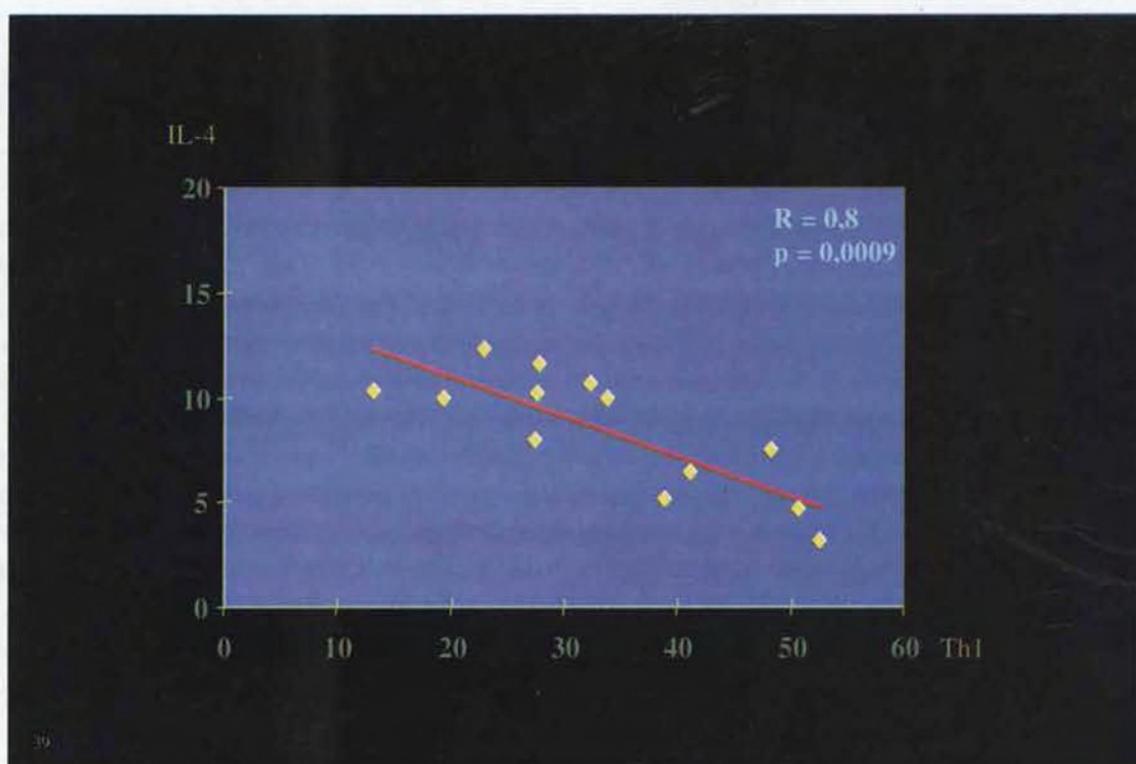


Fig. 39 – Correlação, no LLBA, entre o fenótipo linfocitário Th1 e a IL-4

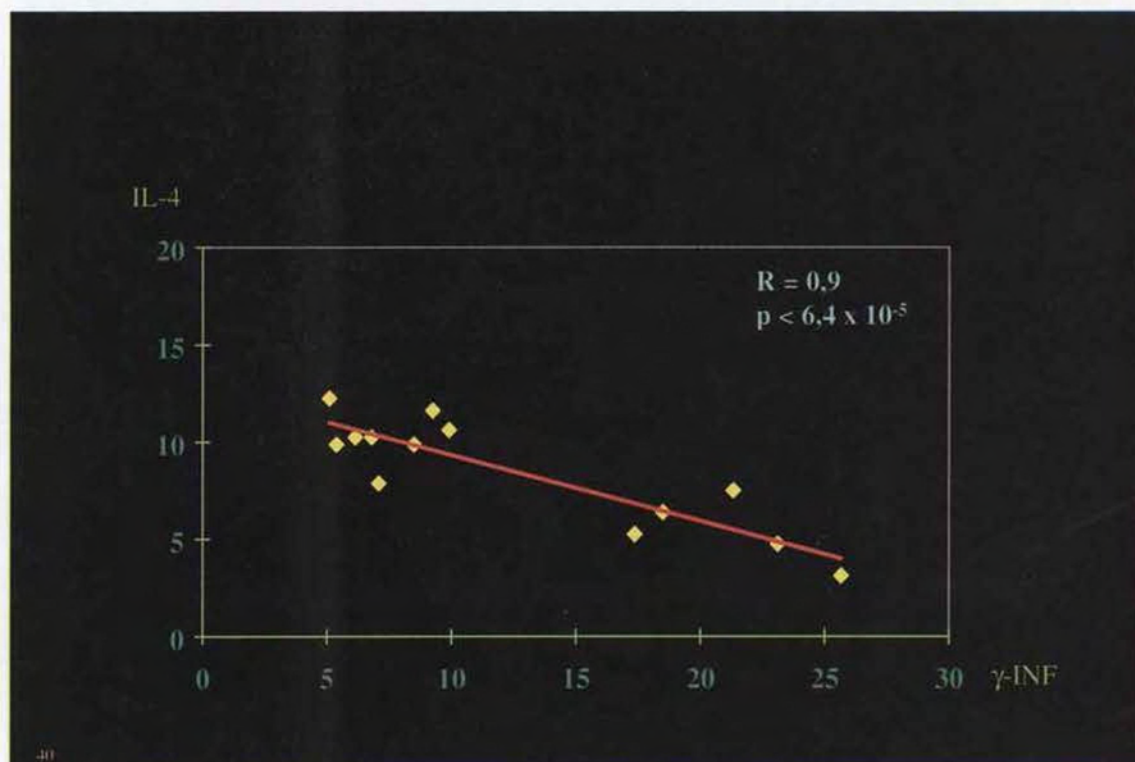


Fig. 40 – Correlação, no LLBA, entre as citocinas γ-INF e IL-4

produção é estimulada pelo macrófago infectado com MTs, através do  $\gamma$ -INF e do TNF- $\alpha$ , parece desempenhar um papel decisivo, pois, nestas circunstâncias, ela actuaria directamente sobre as células CD4 *naive*, com diferenciação de linfócitos Th1, os quais, juntamente com as células  $\gamma/\delta$  e NK, segregariam factores estimuladores da actividade microbiciada do macrófago, num autêntico mecanismo *de feedback*. E CASTRO (14) verificou que a neutralização precoce da IL-12 inviabilizava uma resposta Th1, o que já não acontecia a partir do final da terceira semana de infecção.

Os nossos resultados parecem apontar, na esteira de alguns trabalhos parcelares, para que a comutação ou diferenciação das células Th (Th0?) em Th1 e/ou Th2, que conduza ao predomínio de um destes fenótipos, se efectue apenas no local das lesões, em função do perfil citocínico do respectivo microambiente celular e que se caracteriza, fundamentalmente, pela significativa elevação das taxas de Th2 nas formas graves desta infecção. Com efeito, pudemos verificar, de acordo com ZHANG (33), que no sangue periférico (Fig. 41) o desenvolvimento da TP está associado a uma pequena queda dos fenótipos Th1, mas sem aumento dos Th2, sendo possível constatar que os teores destas células neste meio biológico diminuíam à medida que a doença se agravava.

A importância patogénica destes fenótipos linfocitários parece igualmente atestada pelo facto de a sua cinética, e respectivo padrão citocínico no pulmão atingido por uma infecção tuberculosa, variar através do tempo e correlacionar-se com o tipo e importância da injúria tecidual (34).

Na presença destes resultados caberá interrogarmo-nos sobre as razões que levam à criação de um ambiente citocínico propício à diferenciação das células CD4 em Th1 ou Th2. Embora não se encontrem ainda suficientemente esclarecidos os mecanismos que regulam estes fenómenos parece incontroverso que alguns factores poderão ser decisivos neste contexto, como o tipo e quantidade de antígeno, a via de imunização, os factores genéticos, a actividade hormonal, a própria idade do doente, etc.

Assim por exemplo:

- EBTEBAR (35) obteve, em carneiros, duas respostas diferentes em função do antígeno micobacteriano utilizado: com estimulação pelo PPD1 desenvolvia-se um perfil Th2 acompanhado de uma substancial quantidade de IL-5, enquanto que a utilização do PPD2 desencadeava a produção de elevados níveis de  $\gamma$ -INF, típicos de um perfil Th1.
- SURCEL (36) viria igualmente a reconhecer, *in vitro*, que as células mononucleadas do sangue de indivíduos portadores de TB activa e de indivíduos saudáveis sensibilizados apresentavam acentuadas variações dos perfis citocínicos quando estimuladas por dois antígenos micobacterianos (38.000 e 19.000 MW) e por cinco peptídeos sintéticos.
- BERNARD (37) pôde demonstrar a importância da via de imunização no estabelecimento de uma resposta Th1 ou Th2 através da utilização, na infecção pela *Bordetella Pertussis*, de uma vacina celular (potente resposta protectora mediada por Th1) em comparação com uma vacina acelular (resposta Th2 e atraso na eliminação bacteriana).
- GUERY (38) constatou, em estudos conduzidos no rato, que a exacerbação de um perfil Th2 se encontra dependente da dose de antígeno, aliás muito mais expressivamente para as pequenas do que para as elevadas doses, sem que neste fenómeno interfira qualquer predisposição genética.
- MITRA (22) verificou que o fenótipo HLA-DR das células apresentadoras do antígeno pode modular a activação Th1 *versus* Th2 na patogénia da infecção pelo *Mycobacterium leprae*.
- Segundo ROOK (39), na TP, a conversão inapropriada de um perfil Th1 em Th2 poderá resultar de subtis alterações endócrinas causadas pelo MT e pela resposta orgânica a este bacilo. Para este autor, o balanço Th1/Th2 não será determinado pelos epítopos, mas sim por estes

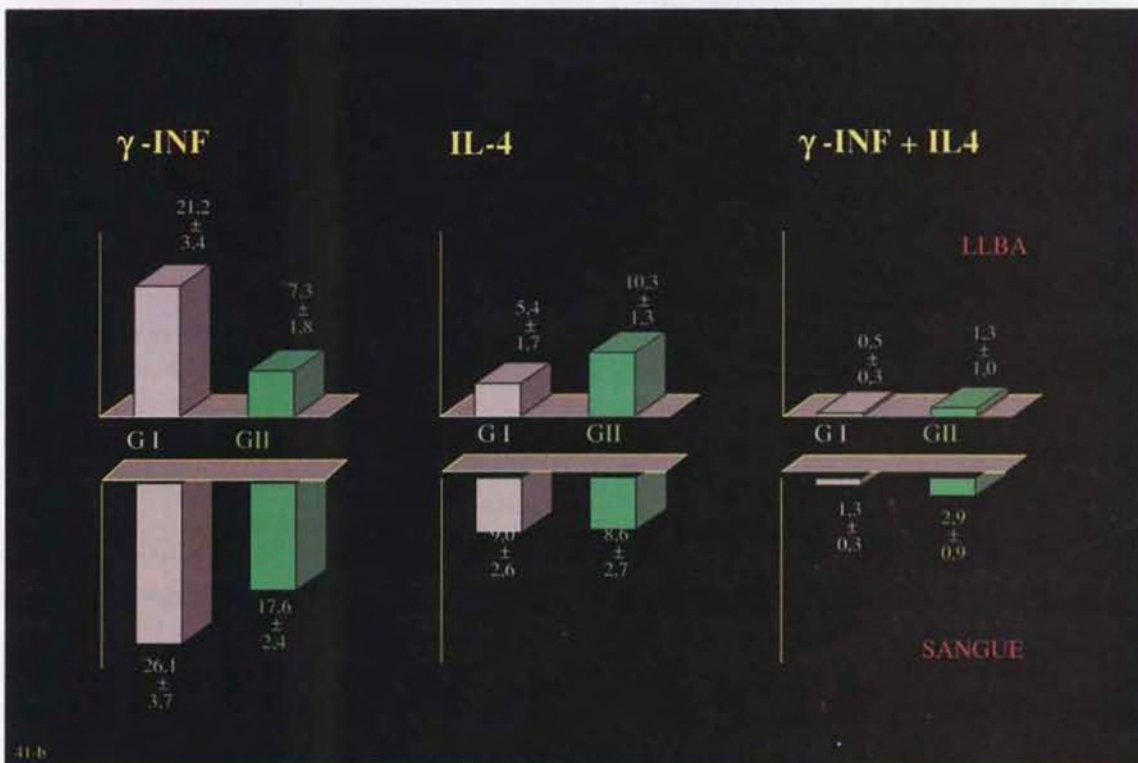
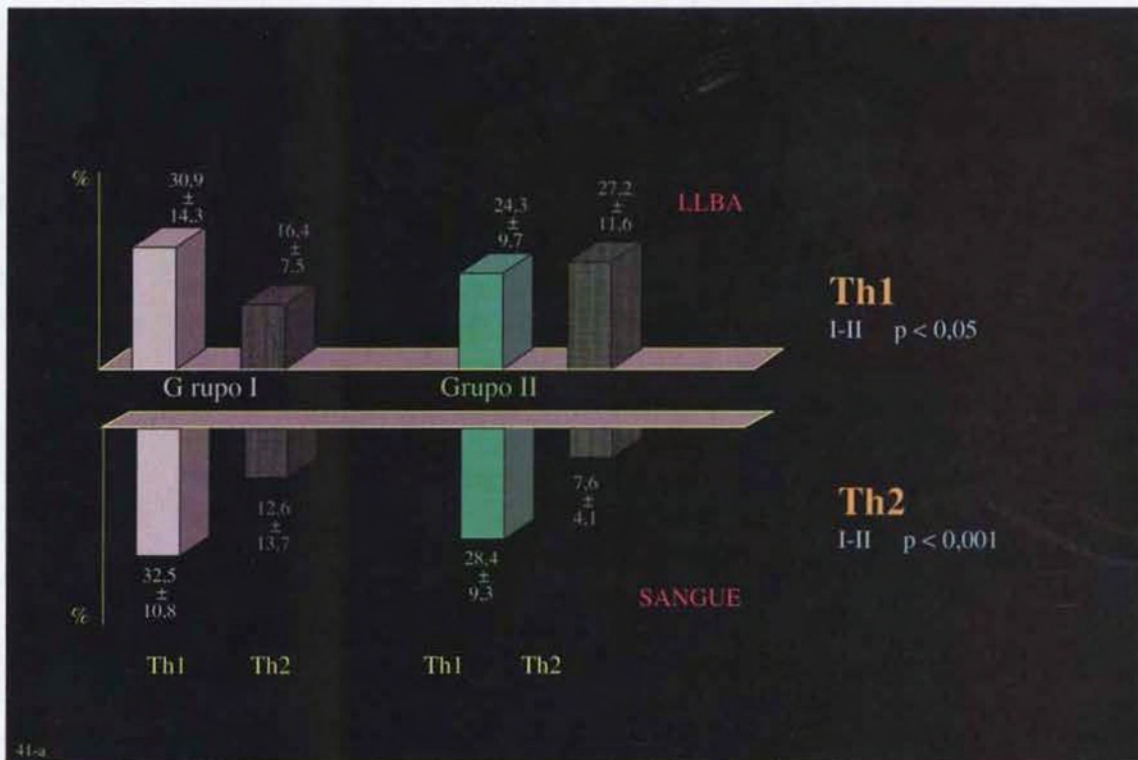


Fig. 41 – Comparação, entre o LLBA e o sangue periférico, dos perfis Th1/Th2 (celular (a) e citocínico (b)) nos Grupos I e II

fenómenos hormonais associados aos efeitos adjuvantes dos componentes microbianos (apenas começados a definir), desempenhando as citocinas o papel de mediadores nestas vias.

De facto, este autor pôde confirmar, na TB, particularmente nas suas formas graves, um aumento das taxas de cortisol plasmático, resultante de uma acrescida conversão da cortisona em cortisol, processo este mediado pela enzima hepática  $11\beta$ -HSDI. Ora, quando estes fenómenos ocorrem no pulmão poderão contribuir para a ineficácia funcional do macrófago e do linfócito T.

Por isso, o cortisol, assim como os glucocorticoides, ao inibirem a produção de  $\gamma$ -INF e de IL-2, são imunossuppressores e susceptíveis de provocarem a reactivação da TB, já que esta anomalia cortisónica parece apresentar fundamentos constitucionais, o que explica que não se encontre completamente resolvida, mesmo em doentes tratados. Entretanto, sabendo-se que o sulfato de dehidroepiandrosterona representa um potente antagonista da actividade imunorreguladora do cortisol, não admira que o espectro de gravidade da TB, representado pelo balanço celular Th1/Th2, se encontre intimamente ligado às variações da relação cortisol/sulfato de dehidroepiandrosterona.

- Um factor de agravamento face à infecção tuberculosa reside no aumento da idade, pois a relação Th1/Th2 não permanece imutável ao longo da vida. Com efeito, se parece incontroverso que o modelo Th2 se apresenta similar nos jovens e nos idosos, o mesmo se não passa com o Th1, o qual diminui com o decurso do tempo, por forma a que o número destas células produtoras de  $\gamma$ -INF, que nas idades mais jovens ronda os 71%, venha a cair para os 39% a partir dos setenta anos. Pelo contrário, as células Th0, simultaneamente produtoras de  $\gamma$ -INF e de IL-4, que nas idades mais baixas não ultrapassam 25.8%, alcançam nos idosos, a percentagem de 57.6% (40).

O conjunto dos nossos doentes encontrava-se numa faixa etária correspondente à idade média da vida, pelo que este fenómeno não deverá ter influenciado a sua situação imunitária, mas, face ao alargamento dessa idade média, é bem possível que ele assuma uma notória importância no preocupante aumento da incidência da TB nos grupos etários situados para além dos sessenta e cinco anos, a qual vem ocorrendo em numerosos países, incluindo Portugal.

Assim, os resultados obtidos com o estudo dos perfis Th1/Th2 (celulares e citocínicos) e o conhecimento da influência sobre eles exercida pelo balanço da relação cortisol/sulfato de dehidroepiandrosterona, permitiu-nos elaborar um esquema que abarque o comportamento dos mecanismos patogénicos envolvidos na TB. Com efeito, a introdução que nele efectuámos dos dados relativos a esses parâmetros possibilita-nos uma melhor compreensão da evolução clínica da TB, em função do predomínio de um dos perfis, Th1/Th2, no microambiente das respectivas lesões e a influência que exercem sobre a capacidade microbicida da célula macrófaga (Fig. 42).

De facto, o perfil Th1 constitui um elemento fundamental no processo de resistência orgânica à infecção tuberculosa face à sua correlação com a actividade pró-inflamatória, e isto porque a IL-2 é considerada o mais potente factor de expressão das células T e o  $\gamma$ -INF o mais importante activador dos macrófagos.

Por isso as relações IL-2/IL-10 ou  $\gamma$ -INF/IL-10 poderão constituir importantes índices de avaliação do ambiente citocínico presente no pulmão profundo.

E a corroborar o relacionamento do perfil citocínico das áreas pulmonares lesadas com a capacidade funcional dos macrófagos alveolares aí residentes, perfilam-se os resultados que obtivemos com o estudo da auto-fluorescência destas células. Na verdade, embora tenhamos presentes as limitações que poderão ser colocadas à utilização desta técnica, não deixa de impressionar vivamente a queda muito significativa, particularmente nas determinações efectuadas para

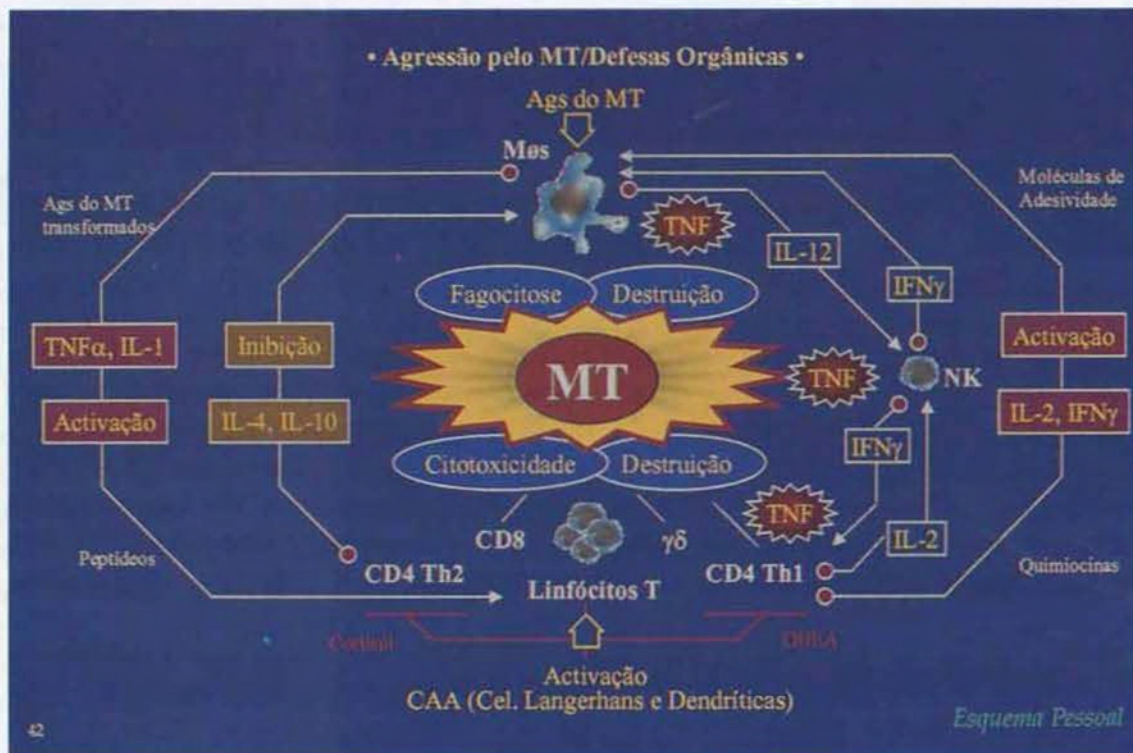


Fig. 42 – Esquema destinado a integrar os principais factores que intervêm nos mecanismos patogénicos da tuberculose pulmonar

além dos 100 canais, que observámos nas situações clínicas mais severas, em perfeita sintonia com um perfil citocínico desfavorável – predomínio de Th2 e excesso de IL-4.

Uma outra citocina reconhecidamente importante no espectro citocínico envolvido na infecção tuberculosa é o TNF- $\alpha$ , face à influência que exerce no reforço da resposta orgânica aos antigénios micobacterianos, na sequência da sua síntese, principalmente pelos linfócitos T e pelo macrófago alveolar. Com efeito, parece indiscutível a importância da sua participação na co-estimulação que conduz à resposta granulomatogénica, a qual constitui um decisivo mecanismo de defesa face à infecção tuberculosa. E a atestar essa influência citaríamos, entre muitos argumentos, o facto de CHENSUE (41) ter constatado que a sua depleção *in vivo* conduz a uma diminuição de aproximadamente 40% das formações granulomatosas. Mas para outros investigadores, como ROOK (8)

e HERNANDEZ-PANDO (42), o TNF- $\alpha$  poderá desempenhar, na TB, uma função dupla. Assim, para estes autores, entre outros, a actividade protectora, com estimulação adicional dos macrófagos alveolares, apenas se exprimirá quando as respostas imunes se efectuarem através dos Th1, pois, com respostas mistas (Th1+Th2 ou Th1+Th0), o TNF- $\alpha$  teria uma intervenção lesiva, consubstanciada na necrose, o que parece ocorrer nas formas crónicas desta afecção, onde a resposta orgânica se encontra ausente ou muito diminuída, com manutenção de uma intensa agressão bacilar e com tendência para uma alteração funcional das células T, através de um perfil Th2.

Assim, o facto de o perfil Th1 se encontrar intimamente ligado à actividade granulomatogénica constitui um pesado argumento a favor dos mecanismos desempenhados por estas células nos processos defensivos do organismo. E por isso se pode reconhecer nos granulomas tuberculosos, os quais constituem a marca



mais fidedigna desta patologia e cuja formação se dirige à contenção da doença, a presença de variados elementos celulares, como os macrófagos, os linfócitos T-CD4, CD8 e  $\gamma/\delta$ , os polimorfonucleares neutrófilos e as células epitelioides e gigantes de Langhans, acompanhados, aliás, em condições normais, por abundantes quantidades de pró-colagénio tipo I, no interior e na periferia dessas formações, características de uma fibrose activa.

A estimulação indispensável à formação destes granulomas reside na actividade de certos componentes micobacterianos e de diversos mediadores como o  $\gamma$ -INF, a IL-2, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , esta última com origem nos macrófagos activados, embora CHIZZOLINI (43) tivesse demonstrado, no animal, a possibilidade da sua síntese, em apreciáveis níveis, pelas células Th1 aquando dos contactos inter-celulares dos clones Th1 com as células monocíticas, no decurso das respostas inflamatórias granulomatogéneas.

Neste contexto, também as quimiocinas parecem assumir um papel extremamente relevante, sobretudo no âmbito da regulação da expressão das células T (42). Com efeito, foi já reconhecido que os níveis de proteína 1-quimiotactil dos monócitos (PIQM), espontaneamente produzida nos granulomas tuberculosos, mas igualmente nos macrófagos isolados após indução por antígenos micobacterianos, se encontram elevados nas situações clínicas ligadas a um perfil Th2. Este fenómeno pode ser igual e experimentalmente detectado através da depleção do  $\gamma$ -INF, obtendo-se, pelo contrário, um efeito oposto com o esgotamento da IL-4 (41).

E o facto de a PIQM inibir a produção macrofágica de IL-12 parece testemunhar um potencial efeito directo sobre estas células.

Assim, as quimiocinas poderão constituir os elementos ideais para o reconhecimento das células efectoras específicas nos locais inflamatórios, face à actividade quimiotactil selectiva. Por exemplo, a expressão de três quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES) foi já relacionada com a resposta Th1 ao antígeno da bactéria estudada (44).

A morte intra-macrofágica do MT, ou a sua quiescência, que ocorrem a nível do granuloma e mesmo durante a sua evolução para a necrose caseosa sólida, neste caso já com o concurso dos ácidos gordos presentes e de mecanismos citolíticos directamente dirigidos ao macrófago infectado, a cargo das células T-CD4 produtoras de  $\gamma$ -INF, dos T-CD8 e dos T- $\gamma/\delta$ , contribuem igualmente para a contenção da doença, ao dificultarem a multiplicação bacteriana.

É a fase de tuberculose-infecção, consubstanciada na hipersensibilidade assinalada pela positividade da intradermo-reacção aos derivados proteicos do MT (Fig. 43).

A importância das células T- $\gamma/\delta$  nos mecanismos de defesa perante a infecção micobacteriana manifesta-se ainda pela sua capacidade citotóxica (fig. 42). Também aquelas que são dotadas de actividade NK (T-CD56) contribuem para o controlo desta afecção, não só pela influência que exercem sobre a diferenciação dos Th1 através do  $\gamma$ -INF, mas igualmente pelas propriedades citolíticas exercidas através das citocinas LAK (*lymphocyn activated Killer*) dirigidas especificamente contra células infectadas pelo MT, sendo essa actividade mediada, na sua maior parte, pela IL-2.

Ora, os nossos resultados parecem encontrar-se de acordo com estes conceitos, já que, tanto as células T- $\gamma/\delta$ , como a actividade NK marcada pelo CD16CD56, revelaram, no LLBA, uma diminuição da percentagem destes elementos celulares nas situações clinicamente mais graves.

A importância, muito relevante aliás, da capacidade citolítica das células CD4 e CD8 reside na possibilidade de estes elementos celulares exercerem um efeito imunorregulador sobre a resposta Th2/Th0, através da lise mediada pelo Fas, de uma forma Fas-dependente. De facto HAHNS (45) demonstrou, recentemente, que os Th1 com expressão Fas-ligando m RNA, assim como os linfócitos CD8, lisavam células Th2 e Th0, fenómeno este que parece ser estimulado e ampliado pela IL-12. Esta actividade

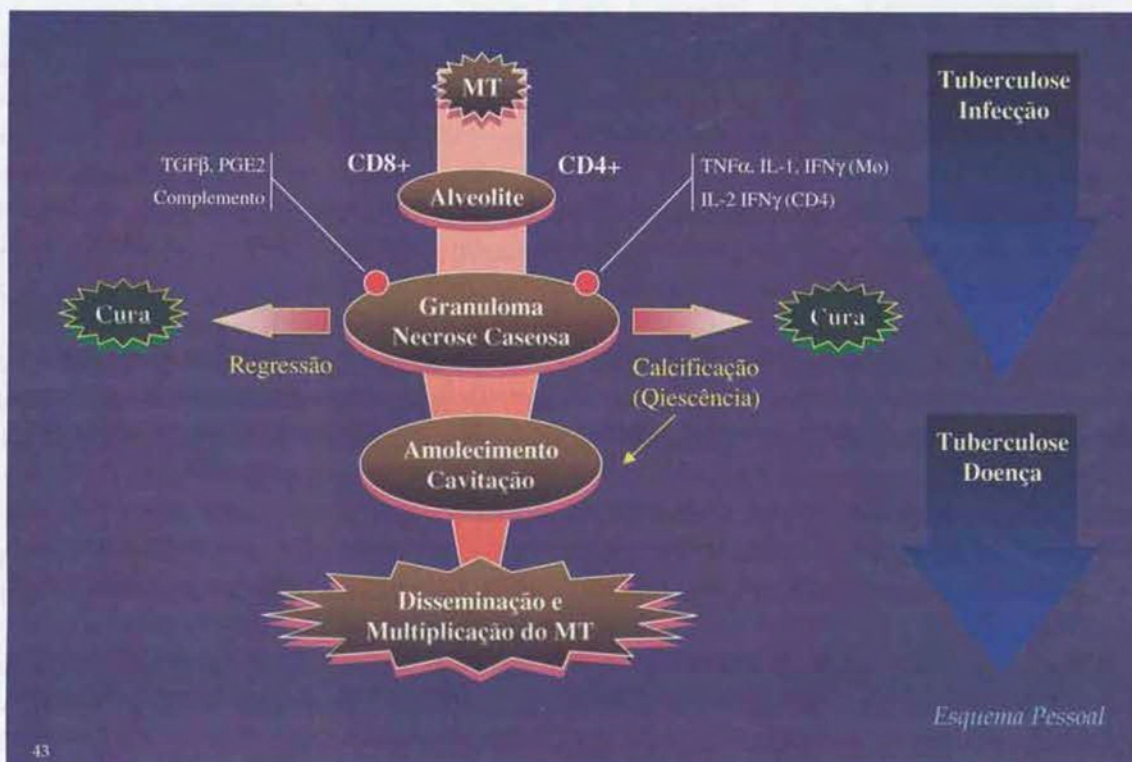


Fig. 43 – Esquema fisiopatológico da infecção tuberculosa na sequência da inalação do *Mycobacterium tuberculosis*

funcional do Fas-ligando nos Th1 seria mediada e potenciada pelo factor  $\gamma$ -INF indutor (recentemente proposto como IL-18), dado que os anticorpos anti- $\gamma$ -INF não bloqueiam o  $\gamma$ -INF indutor adstrito à citotoxicidade dos Th1 citotóxicos. Na ausência de uma evolução favorável das lesões granulomatosas e caseosas sólidas, representada pela regressão dessas formações e pela fibrose ou pela calcificação das áreas atingidas, assiste-se à progressão da infecção através do amolecimento, liquefação e constituição de cavidades, após eliminação do *caseum*, em cujas paredes a multiplicação extra-macrofágica do MT se encontra particularmente exaltada. É a fase de tuberculose doença e dos fenómenos de disseminação que tantas vezes a acompanham (Fig. 43).

Estes processos necróticos, frequentemente dependentes de uma quebra dos mecanismos de defesa específica, são típicos, como se pode apreciar através do estudo das formas clinicamente graves que integram o nosso conjunto de doentes, de um perfil

cotínico-linfocitário Th2, ligado ao paralelo incremento de uma actividade imunossupressora. São as situações com diminuta resposta medicamentosa, mesmo frente a bacilos sensíveis e estratégias terapêuticas correctamente instituídas.

Nestas circunstâncias, parece tentadora a junção ao esquema terapêutico de fármacos imunomoduladores, particularmente de  $\gamma$ -INF, numa tentativa de estimulação da capacidade microbicida do macrófago alveolar, já que a reconversão do perfil Th2 em Th1 não parece viável uma vez instituído. De facto, mesmo que se consiga diminuir a quantidade de Th2, o que foi já realizado através de uma proteína mutante do receptor da IL-2 (IL-2 Y 238 D), não se restaurará o nível de  $\gamma$ -INF.

Por outro lado, ao aceitar-se a compartimentação destas perturbações, que, aliás, ainda muito recentemente BAUMER (46) demonstrou em relação às formas pulmonares de sarcoidose, será igualmente

tentadora a sua administração por via inalatória. E, de facto, CONDOS (47), numa investigação efectuada há alguns meses e com resultados ainda muito preliminares, dá-nos conta do interesse e excelente tolerância da aplicação de  $\gamma$ -INF aerossolizado em portadores de TP multirresistente, associado aos medicamentos de segunda linha.

Mas, a aplicação adjuvante de medicação imunomoduladora, directamente efectuada no pulmão profundo, pressupõe uma prévia e indispensável avaliação do estado imunitário do doente, a qual, em função destes resultados, deverá ser obtida através da LBA nos locais atingidos.

Foi neste contexto que desenvolvemos este projecto de investigação – tentar contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos patogénicos que na intimidade do pulmão profundo comandam as perturbações responsáveis pela gravidade do espectro clínico da tuberculose, indispensável para a aplicação

de novas vias terapêuticas, nas quais se inclui a imunomodulação.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no decurso deste projecto de investigação sugerem as seguintes conclusões:

- A gravidade da tuberculose pulmonar estende-se ao longo de um espectro limitado por dois polos (Fig. 44): um deles, caracterizado, no microambiente celular, por um perfil citocínico e celular do tipo Th1 que através das citocinas que lhe estão adstritas, particularmente do  $\gamma$ -INF, mas também da IL-2 e do TNF- $\alpha$ , promove a estimulação funcional do macrófago alveolar, nomeadamente a sua capacidade microbicida, o que confere ao organismo uma resistência a esta agressão; um outro, marcado por um perfil Th2 no qual partici-

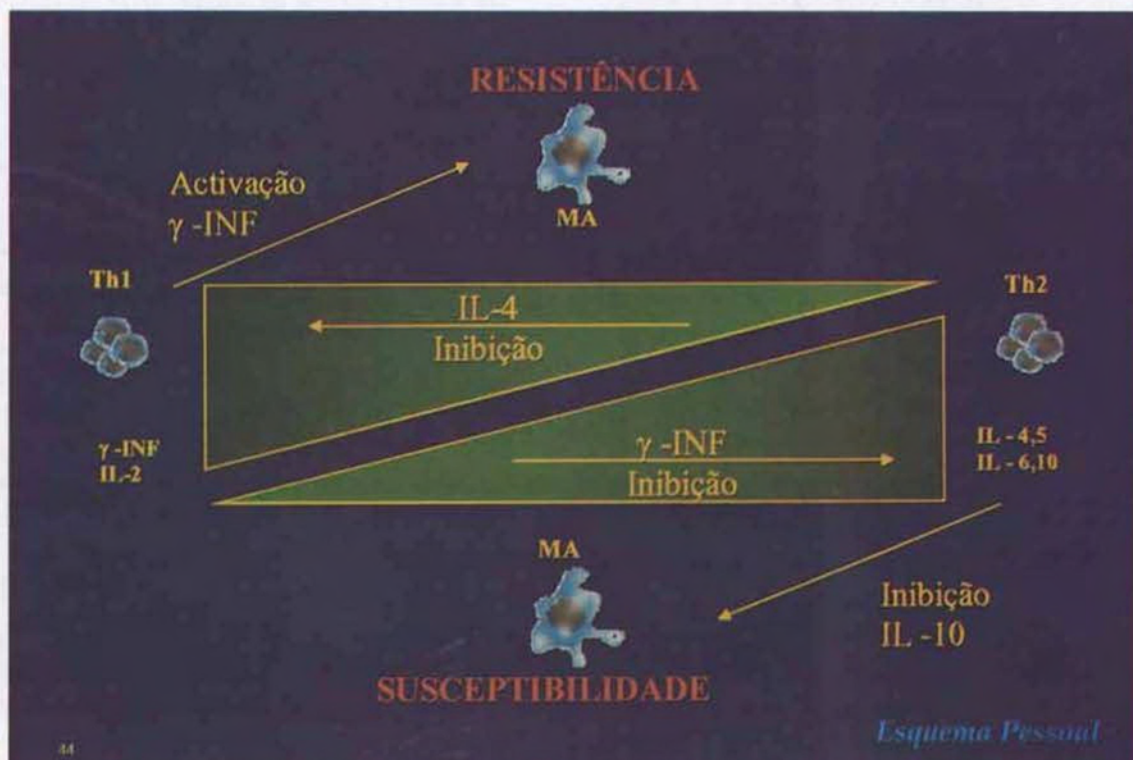


Fig. 44 – Esquema relativo ao espectro da gravidade da tuberculose pulmonar em função dos perfis Th1/Th2

pam, para além destes elementos celulares, várias citocinas (IL-4 e IL-10, entre outras) que conduzem à inibição macrofágica, tornando estes doentes mais susceptíveis à infecção. No entanto, a maioria das situações espraia-se entre estes dois polos, nuns casos mais perto do Th1, noutros mais próximo do Th2.

- Assim, aquilo que sob o ponto de vista imunitário melhor caracteriza a gravidade da tuberculose pulmonar é a elevação local da percentagem de Th2 e respectivas citocinas.
- Clinicamente, os indivíduos nos quais predomina um perfil Th1 são atingidos por formas menos graves, radiologicamente limitadas, pouco escavadas, com diminuto número de bacilos, reduzido componente exsudativo e que respondem rápida e favoravelmente à medicação instituída. Pelo contrário, quando citocinicamente se sobrepõe um perfil Th2, a expressão clínica é grave, habitualmente bilateral, com muitas cavernas, muito bacilífera, com grande rebate sobre o estado geral e de difícil tratamento, mesmo com antibióticos sensíveis em esquemas correctamente elaborados.
- Estas variações dos perfis Th1/Th2 ocorrem fundamentalmente no pulmão profundo, já que no sangue periférico o Th1 predomina sempre sobre o Th2, independentemente da gravidade das lesões.
- Este facto sugere que a avaliação da capacidade de resposta imunitária à infecção micobacteriana deverá ser efectuada localmente, através da lavagem broncoalveolar, pois é no pulmão profundo que as células Th (Th0?) se diferenciam em Th1 ou Th2, influenciadas pelo microambiente citocínico presente nessas áreas.
- O conhecimento da cinética linfocitária Th1 e Th2, assim como da actividade citocínica, nas regiões atingidas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, permite-nos acalentar fundamentadas esperanças na terapêutica imunomoduladora, em situações clinicamente graves que não respondem satisfatoriamente à terapêutica instituída.
- Entretanto, a compartimentação das perturbações imunitárias no pulmão profundo sugere o provável interesse da utilização da via inalatória neste tipo de intervenção medicamentosa.

## BIBLIOGRAFIA

1. RIEDER HI, CAUTHEN GM, COMSTOCK GW, SNIDER DE Jr. Epidemiology of tuberculosis in the U.S.A. *Epidemiol. Rev.* 1989; 11: 79-88.
2. MORBILITY AND MORTALITY. Chartbook on Cardiovascular, Lung and Blood Diseases. *Ed National Institutes of Health, U.S.A.*, 1996.
3. RAVIGLIONE MC, SUDRE P, RIEDER HI, SPINACI S, KOCHI A. Secular trends of tuberculosis in Western Europe. *WHO Bulletin*, 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: 1545-1553.
5. RAVIGLIONE MC, RIEDER HL, STYBLO K, KHOMENKO AG, KOCHIA. Tuberculosis trends in Eastern Europe and the former USSR. *Tubercle and Lung Diseases*. 1994; 75: 400-416.
6. BAGANHA MF. Situação da tuberculose em Portugal. Análise epidemiológica da sua evolução nos últimos anos. *Arq. Soc. Port. Pat. Resp.* 1988; 1: 9-17.
7. BAGANHA MF. Epidemiologia da tuberculose. *Pathos* (Monografias de Patologia Geral). 1997; 5: 7-14.
8. ROOK GA, HERNANDEZ - PANDO R. T cell helper types and endocrines in the regulation of tissue damaging mechanisms in tuberculosis. *Immunobiology* 1994; 191: 478-492.
9. BAGANHA MF. Aquisições recentes no diagnóstico da infecção tuberculosa. Comissão de Trabalho da Tuberculose. Monografia. *Ed. SPPR*. Évora. 1989; 11-21.
10. BAGANHA MF. Patogenia da tuberculose. *Pathos* (Monografias de Patologia Geral). 1997; 5: 15-23.
11. TSUYUGUCHI I. Immunology of tuberculosis and cytokines. *Kekkaku* 1995; 5: 335-346.
12. FLESCHE IE, KAUFMANN SH. Role of macrophages and alpha-beta T lymphocytes in early interleukin 10 production

- during *Listeria monocytogenes* infection. *Int. Immunol.* 1994; 3: 463-468.
13. KAUFMANN SH, LADEL CH, FLESCHE IE. T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. *Ciba Found Symp.* 1995; 195: 123-132.
  14. CASTRO AG, SILVA RA, APPELBERG R. Endogenously produced IL-12 is required for the induction of protective T cell during *Mycobacterium avium* infections in mice. *J. Immunol.* 1995; 4: 2013-2019.
  15. CONRADT P, KAUFMANN SH. Impact of antigen-presenting cells on cytokine profiles of human Th clones established after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immun.* 1995; 5: 2079-2081.
  16. LINDBLAD EB, ELHAY MJ, SILVA R, APPELBERG R, ANDERSEN P. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect. Immun.* 1997; 2: 623-629.
  17. BAGANHA MF, LIMA MA, GARÇÃO F, GONÇALVES FL, REIS V, ANTUNES F, ROBALO CORDEIRO AJA. Estudos imunológicos na tuberculose pulmonar. *O Médico* 1982; 1955: 437-462.
  18. BAGANHA MF, LIMA MA, GARÇÃO F, ROBALO CORDEIRO AJA. Tuberculose pulmonaire et altérations immunologiques. *Bull. D'Union Intern. Contre la Tuberc.* 1983; 58: 256-259.
  19. SHIRAKAWA T, ENOMOTO T, SHIMAZU S, HOPKIN JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-79.
  20. BAGANHA MF, MARQUES MAT, LEITE I, ROBALO CORDEIRO C, TEIXEIRA ML, MOTA PINTO A, ANJOS MJ, LIMA MAM, CORTE REAL R, SERRA E, MALCATA L, LOPES C, NUNES MJ, PÊGO A, SANTOS ROSA MA, MELIÇO SILVESTRE A, ROBALO CORDEIRO AJA. Estudos sobre o pulmão profundo em indivíduos infectados pelo VIH. *Arq. Soc. Port. Pat. Resp.* 1994; 3: 129-148.
  21. DEL PRETE G, DE CARLI M, MASTROMAURO C, BIAGIOTTI R, MACCHIA D, FALAGIANI P, RICCI M, ROMAGNANI S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory - secretory antigen (s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J. Clin. Invest.* 1991; 1: 346-350.
  22. MITRA DK, RAJALINGAM R, TANEJA V, BHATTACHARYYA EC, MEHRA NK. HLA - DR polymorphism modulates the cytokine profile of *Mycobacterium leprae* HPS - reactive CD4+ T cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1997; 1: 6067.
  23. GRANGE JM, STANFORD JL, ROOK GA. Tuberculosis and cancer: parallels in host responses and therapeutic approaches? *Lancet* 1995; 8961: 1350-1352.
  24. HOWE RC, WONDIMU A., DEMISSEE A, FROMMEL D. Functional heterogeneity among patients. Identification of T - cell clones distinct from Th0, Th1 and Th2. *Immunology* 1995; 4: 585-594.
  25. PROBST P, KUNTZLIN D, FLEISCHER B. Th2 - type infiltrating T cells in nickel - induced contact dermatitis. *Cell Immunol.* 1995; 1: 134-140.
  26. D'ELIOS MM, MANGHETTI M, DE CARLI M, COSTA F, BALDARI CT, BURRONI D, TELFORD JL, ROMAGNANI S, DEL PRETE G. T helper effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* 1997; 2: 962-967.
  27. MILICH DR, SCHODEL F, HUGHES JL, JONES JE, PETERSON DL. The hepatitis B virus core and antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.* 1997; 3: 2192-2201.
  28. POPPEMA S. Immunology of Hodgkin's disease - *Baillieres Clin. Haematol.* 1996; 3: 447-457.
  29. SALLUSTO F, CORINTI S, PINI C, BIOCCA MM, BRUNO G, DI FELICI G. Parietária judaica - specific T - cell clones from atopic patients: heterogeneity in restriction, V beta usage, and cytokine profile. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 2: 627-632.
  30. LIN Y, ZHANG M, HOFMAN FM, GONG J, BARNE PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 1996; 4: 1351-1356.
  31. PEARLMAN E, KAZURA JW, HAZLETT FE Jr, BOOM WH. Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth - induced T helper 2 cell responses. *J. Immunol.* 1993; 9: 4857-4864.
  32. ORME IM, ROBERTS AD, GRIFFIN JP, ABRAMS JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 1993; 1: 518-525.
  33. ZHANG M, LIN Y, YER DV, GONG J, ABRAMS JS, BARNES PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995; 8: 3231-3234.
  34. HERNANDEZ-PANDO R, OROZCOE H, SAMPIERI A, PAVÓN L, VELASQUILLO C, LARRIVA - SAHD J, ALCOCER JM, MADRID MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996; 1: 26-33.
  35. EBETKAR M, KHANSARI N. Differential antigenic stimulation influences cytokine production patterns in T cell and CD4+ subpopulations. *Scand J. Immunol.* 1996; 4: 391-397.
  36. SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacteri-

- al antigens. *Immunology* 1994; 2: 171-176.
37. BERNARD A, MAHON BP, WATKINS J, REDHEAD K, MILLS KH. Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0 - *Immunology* 1996; 3: 372-380.
  38. GUERY JC, GALBIATI F, SMIROLDO S, ADORINI L. Selective development of T helper (Th)2 cell induced by continuous administration of low soluble proteins to normal and beta (2) - microglobulin - deficient BALB/C mice. *J. Exp. Med* 1996; 2: 485-497.
  39. ROOK GA, STANFORD JL. Adjuvant, endocines and conserved epitopes; factors to consider when designing "therapeutic vaccines" - *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 2: 91-102.
  40. PAGANELLI R, SCALA E, ROSSO R, COSSARIZZA A, BERTOLLO L, BARBIERI D, FABRIZI A, LUSI EA, FAGIOLO UI, FRANCESCHI C. Shift to Th0 cytokine production by CD4+ cells in human longevity: studies on two healthy centenarians - *Eur. J. Immunol.* 1996; 9: 2030-2034.
  41. CHENSUE SW, WARMINGTON K, RUTH J, LINCOLN P, KUO MC, KUNKEL SL. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. *Am. J. Pathol.* 1994; 5: 1105-1113.
  42. HERNANDEZ - PANDO R, ROOK GA. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 1994; 4: 591-595.
  43. CHIZZOLINI C, CHICHEPORTICHE R, BURGER D, DAYER JM. Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1-beta while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1997; 1: 171-177.
  44. SCHRUM S, PROBST P, FLEISCHER B, ZIPFEL PF. Synthesis of the chemokines MIP-1-alpha, MIP-1-beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J. Immunol.* 1996; 8: 3598-3604.
  45. HAHN S, STALDER T, WERNLI M, BURGIN D, TSCHOPP J, NAGATA S, ERB P. Down - modulation of CD4+ T helper type 2 and type 0 cells by T helper type 1 cells via Fas/Fas-ligand interaction - *Eur. J. Immunol.* 1995; 9: 2679-2685.
  46. BAUMER I, ZISSEL G, SCHLAAK M, MULLER-QUERNHEIM J. Th1/Th2 cell distribution in pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1977; 2: 171-177.
  47. CONDS R, ROM WN, SCHLUGER NW. Treatment of multidrug resistant tuberculosis with aerosolized interferon-gamma: preliminary results - *Am. J. Resp. Critical Care Med.* 1997; 4: A255.