

Anália Zuleika de Castro

***Imunidade Celular de Pacientes Portadores de Tuberculose Pulmonar.
Participação do Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF- β) e
Interferon Gama (IFN- γ)***

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Anália Zuleika de Castro</i>
“ aprovada pela Comissão Julgadora.

20/03/97

[Assinatura]

**Universidade Estadual Campinas
1997**

Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP
Instituto de Biologia

Anália Zuleika de Castro [~]

*Imunidade Celular de Pacientes Portadores de
Tuberculose Pulmonar. Participação do Fator
Transformador de Cres
cimento Beta (TGF- β) e Interferon Gama (IFN- γ)*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na
Área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa Santos[†]

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal [~]

CAMPINAS - SÃO PAULO
1997

9408210



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
TI	Unicamp
C	279i
V	E
TOMBO BC	31057
PROC.	281/97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/07/97
N.º CPD	

CM-00098944-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Castro, Anália Zuleika de
C 279i Imunidade celular de pacientes portadores de Tuberculose pulmonar. Participação do Fator transformador de crescimento (TGF- β) e Interferon gama (IFN- γ)/ Anália Zuleika de Castro. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
100f: illus.

Orientadoras: Leonilda Maria Barbosa Santos, Ilma Aparecida Pachcoal.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

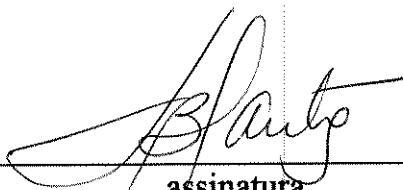
1. Tuberculose. 2. Fator transformado de crescimento-TGF- β .
3. Interferon-IFN- γ . 4. Imunidade celular. I. Santos, Leonilda M. B.
II. Pachcoal, Ilma Aparecida. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 20 de março de 1997.

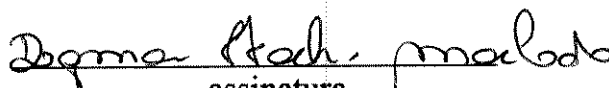
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra Leonilda Maria Barbosa Santos
(Orientadora)


assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

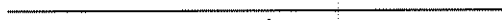

assinatura

Profa. Dra Júlia Keiko Sakurada


assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra Maria Helena S Kramer


assinatura

APROVADA

Trabalho realizado com apoio financeiro recebido da FAEP-UNICAMP, CAPES e FAPESP.

Aos PACIENTES, razão de ser deste trabalho

Toda vida existe

pra iluminar

O caminho de outras vidas

que a gente encontrar

Milton Nascimento - Fernando Brant

*Aos meus pais, Neide e Joaquim,
responsáveis pela minha formação
moral e profissional, e pelo amor,
e dedicação durante minha vida.*

*Ao Murilo Romeiro Sierra,
com amor e gratidão, pelo
carinho, apoio e incentivo.*

*À Profa Dra Leonilda Maria Barbosa Santos,
pela amizade, carinho, com que me acolheu
na orientação deste trabalho, bem como os
valiosos ensinamentos que enriqueceram
nossa formação científica e que tornaram
possível este trabalho.*

*À Profa Dra Ilma Aparecida Paschoal, pela solidariedade,
amizade, estímulo na co-orientação deste trabalho e pelo
seu desprendimento como educadora.*

SE

Se és capaz de manter tua calma quando
Todo o mundo ao redor já perdeu e te culpa,
De crer em ti quando estão todos duvidando
E para esses no momento achar uma desculpa;
Tu, enganado, não mentir ao mentiroso,
Tu, sendo odiado, sempre ao ódio esquivares,
E não parecer bom demais, e nem pretensioso
Se és capaz de pensar - sem que isso só te atires;
De sonhar sem fazer de seus sonhos teus senhores;
Se, encontrando a Desgraça e Triunfo, conseguires
Tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Se és capaz de sofrer a dor, e ver mudadas;
Em armadilhas as verdades que dissestes
E as coisas, por que deste a vida estraçalhadas;
E refazê-las com o bem pouco que te reste;
Se és capaz de arriscar numa única parada
tudo quanto ganhaste em toda sua vida,
E perder e, ao perder sem nunca dizer nada,
Resignando, tornar ao ponto de partida;
Deforçar coração, nervos, músculos, tudo
A dar seja o que for que neles ainda existe,
E a persiste assim quando, exausto, contudo
Resta a vontade em ti, que ainda ordena: PERSISTE !
Se és capaz de, entender a plebe, não te corromperes
E entre Reis, não perder a naturalidade.
E de amigos, quer bons, quer maus te defenderes;
Se a todos pode ser de alguma utilidade;
E se és capaz de dar, segundo por segundo,
Ao minuto fatal todo o valor e brilho:
Tua é a terra com tudo o que existe no mundo,
E o que é muito mais és um homem,
meu filho.

(tradução de Guilherme de Almeida)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre iluminou o meu caminho e sempre esteve presente em minha vida.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professoras Dras. Júlia Keiko Sakurada, Dagmar Ruth Stach-Machado e Maria Helena S. Kramer pela análise crítica e sugestões prévias.

Ao Prof. Dr Paulo Maria Araujo, pela amizade, apoio e confiança em nós depositada durante o início deste trabalho.

Aos Professores Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro e Irineu J.B.de Camargo, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

À Dra Angela Werneck, do Instituto Hélio Fraga - RJ, que gentilmente nos cedeu PPD concentrado tornando possível nossos experimentos

Ao Dr Franscisco Aoki, Silvia e Marcília pelas gentilezas prestadas.

Às Profas Dra. Maria Heloísa S. L. Blotta e Silvia Barros, do Depto de Patologia Clínica do HC-UNICAMP pela atenção e colaboração.

Aos médicos, enfermeiros e funcionários do Instituto Clemente Ferreira, em particular Dr.Reinaldo Cano Garcia, Dr.Jorge Barros Afiune, Dr. Fernando Fiusa de Mello, Dra Conceição, Augusta, Deise, e outros pela colaboração.

A todos colegas funcionários da Broncoscopia pela amizade e agradável convívio, em particular Dona Pedrina, Márcia, Ivone e o Natal.

Às amigas do laboratório 4, Celinha, Eloisa, Elaine, Blanca, Paula, Silvia, Luciana, Karina, Renata, Patricia, Clarissa e outras, pelo companherismo e incentivo constantes em momentos muito difíceis.

Aos queridos amigos Rovilson, Daniele, Wanderly, Angela, Margareth e Adriana, pelo apoio, incentivo e amizade.

A todos os Professores e Colegas da Disciplina de Imunologia, pelo estímulo e colaboração

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo carinho e a colaboração: Dirce, Cristina, Lúcia, Lourdes, Flávio, Dona Ignez, Seu Guilherme (in memorian), Márcia e outros.

À todas as pessoas, que sempre estiveram presentes, participando comigo nesta minha caminhada, os meus sinceros agradecimentos.

A todo o pessoal do Centro Cirúrgico de Ambulatório-HC-UNICAMP, pelo carinho, incentivo e apoio nos momentos em que mais precisei, em particular Beatriz Helena B. P. Souza e Maria Aparecida Furlan.

Aos alunos dos cursos de Medicina, Biologia e funcionários pela disposição em participar deste trabalho.

À minha irmã e meu cunhado Márcia e Guilherme, Mariângela, Vânia e Roberto que estiveram sempre presentes nesta etapa da minha vida.

Ao pessoal do centro de informática da FCM, em especial para Ernane Azevedo pela preciosa colaboração.

Aos meus irmãos: Marcos, Joaquim, Carlinhos, Raul, Mané, Márcia e Marcelo pelo amor e carinho.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO.....	01
II. OBJETIVOS.....	12
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3. 1 População estudada.....	15
3. 2 Pacientes	15
3.3 Indivíduos- controle.....	16
3.4 Reagentes.....	16
3 5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano.....	16
3.6 Cultura de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes.....	17
3.7 Produção de citocinas.....	18
3.8 Dosagem de TGF- β	18
3.9 Dosagem de IFN- γ	19
3.10 Testes cutâneos de hipersensibilidaae tardia.....	20
3.11 Testes estatísticos.....	21
IV. RESULTADOS	22
4.1 Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia.....	23
4.2 Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico humanos estimulados com PPD, MT e PHA.....	24

4.3 Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico humanos estimulados com PPD, MT e PHA, na presença de indometacina.....	29
4.4 Produção de TGF- β por células do sangue periférico humano após estimulação com PHA, PPD e MT.....	31
4.5 Produção de IFN- γ por células do sangue periférico humano após estimulação com PPD, MT e PHA.....	36
 V. DISCUSSÃO	 40
 VI. CONCLUSÃO.....	 50
 VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 52
 VIII. APÊNDICE.....	 69

ABREVIACÕES

APC - Célula apresentadora de antígenos

BCG - Calmette-Guérin

Bk - Bacilo de Koch

BSA - Soroalbumina bovina

CMI- Imunidade mediada por células

Células NK - Células matadoras naturais

CPM - Contagem por minuto

DNCB - Dinitroclorobenzeno

DTH - Hipersensibilidade do tipo tardio

E - C - [= Δ cpm] CPM da radioatividade incorporada nas células cultivadas

³[H]-Timidina triciada

IM - Indometacina

IFN- γ - Interferon gama

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MT - Extrato bruto de *M. tuberculosis* H37Rv

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PGE2 - Prostaglandina E2

PHA - Fitohemaglutinina

PMN - Polimorfonuclear

PPD - Derivado proteico purificado micobactéria

SAB - Soro AB humano

TCR - Receptor de células T

TGF- β - Fator transformador de crescimento β

TNF - Fator de necrose tumoral

I - INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar constitui um dos principais problemas de saúde pública do mundo, atingindo aproximadamente um terço da população mundial, com 8 milhões de novos casos e 3 milhões de óbitos relatados a cada ano pela Organização Mundial de Saúde. (RAVIGLIONE et al., 1995; KOCHI, 1991).

Com o surgimento das drogas antibacterianas, a tuberculose vinha sendo controlada e, por um período, o número de casos chegou a declinar. Havia previsões que no ano 2020 a doença seria erradicada nos EUA. Por volta do ano de 1986, no entanto, a incidência da tuberculose volta a aumentar, e passa agora a ser um grave problema de saúde pública no mundo todo (Centro de Controle de Tuberculose Morbidade- USA -1992, REICHMAN, 1991). Vários são os fatores que favoreceram este aumento da incidência. Um dos mais relevantes foi o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), epidêmica no mundo, embora outros fatores possam ter contribuído, tais como: o confinamento de indivíduos em presídios ou em instituições para idosos, indivíduos que passam por situações de estresse, as baixas condições sócio-econômicas da população e o aumento do uso do álcool e drogas (BLOOM & MURRY, 1991; PERSON et al., 1992). Além destes fatores, há o aparecimento de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* resistentes às drogas. Esta resistência pode estar associada ao uso inadequado de quimioterápicos, em especial por indivíduos portadores HIV, álcool e drogas aditos, que não fazem o tratamento de forma apropriada.

O agente etiológico da tuberculose é o *Mycobacterium tuberculosis*, gênero *Mycobacterium* pertencente à família *Mycobacteriaceae*. É constituído por bacilos aeróbios, uma espécie aeróbica restrita, que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. É considerada um parasita intracelular facultativo, pois tem a capacidade de sobreviver e se multiplicar tanto no interior de células fagocitárias, como fora delas (KONEMAN et al., 1992). É imóvel, não produtora de esporos, e de

crescimento lento (a divisão celular pode ocorrer em períodos que variam de 12 a 24 horas). É uma bactéria que apresenta uma parede rica em lipídeos, superfície hidrofóbica, muito resistente a vários agentes químicos sendo todavia sensível à ação de agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta. É denominada bacilo álcool-ácido resistente e facilmente detectados quando corados pelo método de Ziehl-Neelsen (KHOMENJO, 1987).

O *M.tuberculosis* pode ser visualizado, principalmente, nas secreções broncopulmonares, através de microscopia direta, a baciloscopia, e através de cultura, o que permite a sua identificação.

A tuberculose é usualmente adquirida através da via inalatória. Cerca de um terço da população do mundial já entrou em contato com *M. tuberculosis*, e aproximadamente 10% destes indivíduos infectados desenvolvem a doença (COMSTOCK, 1982), entretanto, em determinadas populações esta proporção é maior (HOPEWELL, 1995). Em humanos somente de 5 a 10 por cento dos indivíduos infectados desenvolvem doença primária progressiva nos dois anos seguintes a infecção. A maioria dos indivíduos controla a infecção primária, de modo satisfatório, entre duas e dez semanas, a partir da exposição inicial e do desenvolvimento da resposta imune efetiva (ORME et al., 1993; ORME, 1993).

No processo de infecção pelo *M tuberculosis*, além das características físicas das partículas infectantes, devem ser ainda considerados os fatores ligados à variabilidade e virulência dos bacilos, ao número de bacilos aspirados e atividade micobactericida dos macrófagos alveolares. O depósito de bacilos na parede alveolar pode resultar em quatro situações distintas: eliminação dos microrganismos sem vestígio da infecção, infecção crônica assintomática, doença clinicamente ativa logo após a infecção e finalmente, a doença ativa muitos anos após o estabelecimento da infecção inicial (HO & RILEY, 1996).

Indivíduos "virgens" de contato com o bacilo da tuberculose, desenvolvem tuberculose primária, quando contaminados com um número suficiente de bacilos que conseguem vencer os mecanismos de depuração das vias aéreas atingindo as pequenas vias respiratórias e os alvéolos quando são então detectados pelos macrófagos. Estas células mononucleares, agindo de maneira inespecífica, ainda não controladas por mecanismos mais sofisticados do sistema imune, fagocitam os bacilos, numa tentativa de "limpar o ambiente", todavia devido às características específicas dos germes da tuberculose esta tentativa muitas vezes é infrutífera, pois os macrófagos não conseguem impedir que os bacilos se multipliquem, sendo utilizados, inclusive como células hospedeiras. A replicação dos microrganismos no interior dos macrófagos acarreta a destruição das células contaminadas e novos macrófagos são atraídos para o local e repetem o ciclo, fagocitando os microrganismos liberados. Macrófagos infectados atingem vasos linfáticos, depois gânglios linfáticos e, do sistema linfáticos são carregados em direção à circulação sanguínea; em todos esses locais o fenômeno de fagocitose de bacilos, replicação intracelular dos mesmos, explosão de macrófagos abarrotados de microrganismo e nova fagocitose por outros macrófagos e monócitos se repete enquanto a circulação sanguínea se encarrega de distribuir células infectadas para todo o organismo (YOUNG et al., 1975; DANNENBERG, 1984).

A tuberculose secundária é desenvolvida em indivíduos que tiveram contato com o bacilo da tuberculose previamente, resultante de uma nova contaminação por inalação ou da reativação de um foco primário quiescente. A manutenção da ativação depende das condições imunológicas do indivíduos. Qualquer falha da imunidade local ou geral poderá permitir novamente a replicação das micobactérias em qualquer dos "focos primários". O local mais frequente de reativação é o pulmão, provavelmente pelo fato de fornecer as condições ideais para a reprodução das micobactérias, mas ela pode ocorrer em qualquer órgão onde exista granuloma tuberculoso.

Os mecanismos de defesa imune à tuberculose não conseguem impedir que o indivíduo manifeste a doença, apesar do contato prévio, o que significa que a infecção anterior não é protetora.

O fato de o bacilo da tuberculose poder se comportar como um parasita intracelular faz com que ele só possa ser combatido através de mecanismos próprios da imunidade celular (YOUMANS, 1980; SIFFORD & BATES, 1991). As micobactérias, para sobreviverem no interior de células fagocíticas, não agredem o hospedeiro de maneira significativa e a lesão tecidual que existe nestas circunstâncias é causada pela própria resposta imune, ou seja, uma reação de hipersensibilidade exacerbada, levando lesões a teciduais.

A hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) é um tipo de reação que se caracteriza pelo acúmulo das células inflamatórias no local onde os antígenos são instalados. Inicialmente há migração dos polimorfonucleares, seguidos por células mononucleares, com predominância de linfócitos e macrófagos. Estudos histológicos sugerem um efeito direto e destrutivo das células mononucleares sobre as células que contém o antígeno. Linfócitos sensibilizados produzem diversos mediadores químicos que permitem a destruição das células infectadas. Por outro lado, macrófagos ativados pelos fatores resultante da interação antígeno-linfócito sensibilizado podem liberar enzimas capazes de lisar tecidos adjacentes do local da reação. A tuberculose é caracterizada pela agregação e proliferação de macrófagos que formam os granulomas, os quais podem persistir por semanas ou até meses. A reação de hipersensibilidade granulomatosa é em termos de suas consequências clínicas, o tipo mais sério de resposta tardia, causando muitos efeitos patológicos que envolve a resposta mediada por células T. Ela resulta na persistência do antígeno no interior das células mononucleares, já que estes microrganismos não podem ser mortos e eliminados por polimorfonucleares não ativados e podem até mesmo sobreviver de modo preferencial no interior dos fagolisossomos ou citoplasma dos monócitos (DANNENBERG & ROOK, 1994). A erradicação destas bactérias

requer a amplificação da atividade microbicida dos fagócitos via citocinas produzidas pelos linfócitos T.

Células apresentadoras de antígenos infectadas por bactérias que sobrevivem no seu interior, como é o caso da infecção pelo *M. tuberculosis*, normalmente exibem na sua superfície antígenos microbianos complexados com antígenos do MHC. Essa situação permite a detecção desta células pelos linfócitos, vários deles CD4+, CD8+ e linfócitos T $\gamma\delta$ específicos contra esses antígenos que produzem linfocinas capazes de ativar macrófagos, tornando-os capazes de matar estas bactérias ou influir na sua replicação. (KAUFMANN, 1988; FLYNN et al., 1992; JANIS et al., 1989; FLESC & KAUFMANN, 1993).

Com o entendimento da biologia das citocinas, a resposta imune que resulta no controle da replicação dos agentes agressores ou na resposta imune deficiente do hospedeiro, passa a ser visto como o resultado da prevalência do efeito de determinadas citocinas sobre a produção de outras. Os estudos iniciais envolvendo estas macromoléculas descreveram numerosos fatores proteicos, produzidos por determinadas células, e ligados à intermediação de funções específicas em ensaios biológicos particulares.

Atualmente aceita-se as células T CD4+ de murinos podem ser subdivididas de acordo com o padrão de citocinas que são capazes de produzir. Células auxiliares do tipo I (Th1) produzem IL-2, IFN- γ e TNF β enquanto as células tipo II (Th2) secretam IL-4, IL-5, IL-6 IL-9, IL10 e IL-13 (MOSMMAN et al., 1986; ROMAGNANI et al., 1996). Além dos clones de células T que se enquadram no subgrupo 1 e subgrupo 2, existem células ainda não diferenciadas em Th1 e Th2. Estes clones, denominados Th0, provavelmente representem o estágio inicial de células não diferenciadas em Th1 e Th2, (DEL PRETE et al., 1991; ROMAGNANI, 1996; MOSMMAN et al,1986).

Com relação à função dessas subpopulações de células, mostra-se que as células Th1 produtoras de IFN γ e IL-2 estão envolvidas nas reações de hipersensibilidade enquanto as células Th2 são células auxiliares na síntese de anticorpos. Evidências têm se acumulado sugerindo a existência em seres humanos de subgrupos de linfócitos T, Th1 e Th2, semelhantes aos já descritos para murinos (ROMAGNANI et al., 1992).

O padrão de produção de citocina da “imunidade natural” (IFN- γ alto e baixa produção de IL-4) provocado por parasitas intracelulares ou vírus que ativam macrófagos, linfócitos e células NK provavelmente determina o fenótipo da resposta subsequente como o Th1 (CHAN, 1991).

Em camundongos, a imunidade ao parasita *Leishmania major* é imuno-regulada por subpopulações Th1 e Th2. Entre as linhagens de camundongos geneticamente resistente, a resposta tipo Th1 é predominante e a produção de IFN- γ promove a resolução da infecção, com evolução para cura espontânea. Em linhagens susceptíveis observa-se uma tendência a resposta Th2 levando a formas progressivas e letais da infecção. Neste modelo a produção do IFN- γ está relacionada com o desenvolvimento de linfócitos do tipo Th1, enquanto a produção de IL-4 favorece a diferenciação no sentido da resposta Th2 (SHER & COFFMAN, 1992). Nos murinos infectados com *M. tuberculosis*, durante o processo de controle da infecção, pode-se observar dois momentos diferentes da resposta dos linfócitos T CD4+, segundo o padrão de citocina liberado “in vitro” em resposta aos antígenos específicos. Inicialmente, na fase de atividade máxima dos mecanismos de proteção, os linfócitos T CD 4+ produzem preferencialmente IFN- γ . Após 20 a 40 dias de estabelecimento do controle da infecção, os linfócitos T CD 4+ secretam IL-4 (ORME, 1987; ORME, 1988; ORME et al., 1993). Assim, as citocinas envolvidas na proteção à infecção tuberculosa em murinos tende ao perfil do padrão Th1.

No homem, as interações parasita-hospedeiro também são os melhores modelos de estudos das citocinas derivadas de células T, principalmente devido à nítida polarização da secreção de determinadas citocinas observadas nas infecções. As células Th1, através da produção de IL-2 e IFN γ , estão associadas à resistência e a eliminação de patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e *Leishmania major* (BOOM et al., 1987; HAANEN et al., 1991; DEL PRETE et al., 1991; YAMAMURA et al., 1991; HEINZELK et al., 1989; BOOM et al., 1990). Del Prete e colaboradores conseguiram demonstrar que linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais os quais já entraram em contato com antígenos *M. tuberculosis* e *Toxocara canis* respondem em cultura com proliferação quando exposto a cada um destes antígenos. Este procedimento gera clones celulares específicos contra o *M. tuberculosis* e *Toxocara canis*. Sabe-se que a infecção com *M. Tuberculosis* e *Toxocara canis* induz tipos diferentes de resposta imune, que são consistentes com ativação específica de células de padrão Th1 ou Th2, respectivamente. A infecção com *M. tuberculosis* usualmente desencadeia fenômenos de imunidade celular que incluem a hipersensibilidade tardia, enquanto que a infecção com *T. canis* produz aumento de IgE e eosinofilia. Quando o padrão da produção de linfocinas de uma série de clones específicos de células T para PPD e antígenos específicos de *T. canis* foi determinado, observou-se uma diferença muito clara entre os dois clones através dos tipos de linfocinas secretadas; clones específicos para PPD produziram linfocinas típicas de linfócitos Th1 enquanto os clones específicos de *T. canis* produziram linfocinas com o padrão de Th2.

As citocinas produzidas por cada uma das subpopulações são conhecidas pela propriedade de inibir a proliferação, síntese e atividade biológica das citocinas secretadas pela subpopulação oposta (MOSMMAN & MOORE, 1991). Desta forma, IFN γ produzido por linfócitos Th1 age negativamente sobre a população Th2, inibindo a síntese de IL-4, por outro lado produtos das células Th2 como IL-4 e IL-10 também podem inibir a síntese de IFN γ (SWAIN et al., 1991). Citocinas como

TGF β , que não se enquadram obrigatoriamente como produto de Th1 e Th2, podem inibir a produção de citocinas pelas células Th1, como ocorre com a produção de IFN γ nas parasitoses (SILVA et al., 1991; ROOK et al., 1986).

O TGF β pode ser produzido por linfócitos T ativados (KEHRL et al., 1986 (a); BRISTOL et al., 1990), linfócitos B (KEHRL et al., 1986(b)) e macrófagos (ASSOIAN et al., 1987; GROTE DORST et al., 1989; LEWIS et al., 1989; KEHRL et al., 1986). O fator transformador de crescimento beta compreende uma família de peptídeos conhecida por atuar negativamente sobre uma série de funções imunológicas. Estudos "in vitro" mostram que o TGF β inibe a proliferação de linfócitos T (KEHRL et al., 1986; RUEGEMAR et al., 1990; SIELP et al., 1988; LEE & RICH, 1991), atividades das células NK (ORTALDO et al., 1991), e citotoxicidade (SHALABI & AMMAN, 1991; RANGESD et al., 1987). O fator transformador de crescimento beta (TGF- β) inibe a síntese de citocinas produzidas por macrófagos e diminui a expressão de MHC de classe II (ESPENIK et al., 1987; CZARNIECKI et al., 1988). O TGF- β também inibe a proliferação de células T dependentes de IL-2 e expressão de receptores de IL-2 (KEHRL et al., 1986; ORTALDO et al., 1991).

Estudos realizados no modelo de tuberculose experimental mostraram a capacidade do TGF- β em antagonizar a ação do IFN- γ e TNF- α na ativação de macrófagos (TISUNAWAKI et al., 1988; DING et al., 1990). O IFN- γ aumenta a atividade antimicrobactericida de macrófagos quando os mesmos são neutralizados por anticorpos anti-TGF- β , e sua interferência negativa na síntese de produtos da cadeia intermediária do metabolismo do nitrogênio (FLESCH & KAUFMANN, 1991). Vários relatos na literatura têm mostrado que a produção excessiva de TGF- β por células do sistema fagocítico-monocitário de indivíduos infectados com MT leva a deficiência no controle da replicação dos bacilos. O TGF- β é sintetizado em

maior quantidade por monócitos de pacientes portadores de tuberculose, células gigantes de Langerhan e células epiteliais em granulomas tuberculosos também expressam RNAm para TGF- β (TOOSSI et al., 1995), sugerindo que a produção no local dos sítios infecciosos pode resultar na desativação dos macrófagos. Macrófagos humanos infectados com linhagens virulentas *M. avium* “in vitro”, produzem altos níveis de TGF- β ; quando foi adicionado o anticorpo neutralizante anti-TGF- β , verificou-se que o IFN γ e TNF- α tiveram seu efeito bactericida potencializados. Estes resultados sugerem que TGF- β inibe a resposta imune antimicobacteriana e facilita a sobrevivência da micobactéria (BERMUDEZ, 1993).

O interferon gama (IFN- γ) tem um papel notável no controle da infecção tuberculosa de murinos (FLESCH & KAUFMANN, 1993), é produzido por clones de subpopulações de células Th1 ativadas, células NK e CD8, melhora a atividade antimicobacteriana em macrófagos de murino, provavelmente, através produção de metabólicos como o peróxido hidrogênio e óxido nítrico (FLESCH & KAUFMANN, 1991; CHAN et al., 1992). Experimentos realizados em camundongos GKO, com deficiência genética para a síntese de IFN- γ , mostram que estes animais são incapazes de controlar a infecção pelo BCG e *M. tuberculosis*, morrendo de infecção disseminada. Macrófagos de murinos, previamente tratados com IFN- γ e posteriormente infectados com *M. tuberculosis* são capazes de controlar a multiplicação de bacilos. Em protocolos onde os animais são infectados e depois tratados não houve o controle da infecção (HANANO & KAUFMANN, 1995). Estudos realizados em humanos mostraram que a administração IFN- γ reduz o número de bacilos em pacientes portadores de lepra lepromatosa (NATHAN et al., 1986). Os resultados de um estudo que utilizou o IFN- γ como adjuvante no tratamento de pacientes com doenças bacterianas refratárias ao tratamento, sugeriram que o IFN- γ , de fato, desempenha um papel essencial no controle da infecção micobacteriana humana (HOLLAND et al., 1994). A detecção de altos

níveis de IFN- γ e TNF- α , no líquido pleural de pacientes com tuberculose é uma evidência do envolvimento dessas citocina na infecção (BARNES et al., 1993; ZAHANG et al., 1994). Estudos realizados utilizando macrófagos e linfócitos de lavados brônquio-alveolares de pacientes com tuberculose pulmonar mostraram que os mesmos expressam, de forma aumentada, RNA mensageiro para IFN- γ , comparados ao grupo controle (ROBINSON et al., 1994). Embora, vários argumentos sugiram que o IFN- γ favoreça a morte micobacteriana é necessário ter em mente que há controversias, pois outros autores não conseguiram demonstrar o efeito antimicobacteriano dessas citocinas (DOUVAS et al., 1985; SHIRATSUCHI et al., 1990)

A tuberculose que sempre foi um problema de saúde pública em países em desenvolvimento como o Brasil, com o aparecimento da AIDS, se tornou epidêmica em todo o mundo, atingindo uma incidência alarmante. Os mecanismos imunológicos envolvidos na interação *Mycobacterium tuberculosis* e hospedeiro não estão totalmente conhecidos. Em particular a imunidade de indivíduos que desenvolvem resistência às drogas anti-micobacterianas, também é muito pouco estudada. Assim, no presente trabalho foi nosso objetivo estudar alguns parâmetros da resposta imune celular de indivíduos portadores de Tuberculose pulmonar “virgens” e refratários ao tratamento, comparados ao grupo controle normal.

II - OBJETIVOS

Visto que os mecanismos de resistência do hospedeiro à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* não são completamente conhecidos e devido ao grande número de casos de tuberculose encontrados atualmente nos ambulatórios de tisiologia, e mais ainda, a resistência às drogas, este trabalho tem por objetivo investigar aspectos da imunopatogenia da tuberculose pulmonar humana através da:

- Avaliação da imunidade celular “in vivo” através de testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (PPD, tricofitina, candidina e DNCB), em indivíduos portadores de tuberculose pulmonar.

- Avaliação da proliferação celular “in vitro” através da transformação blástica de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar “virgens” de tratamento e refratários ao tratamento e indivíduos normais, estimulados com mitógenos inespecíficos (PHA), antígenos específicos PPD, MT na presença ou não de indometacina.

- Determinação dos níveis de TGF- β produzidos por células do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar “virgens” e refratários ao tratamento e indivíduos normais.

- Determinação dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de linfócitos dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar “virgens” e refratários ao tratamento e indivíduos normais.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População estudada: Os doadores de sangue envolvidos neste estudo eram todos voluntários e foram informados que o sangue seria utilizado em pesquisa básica. O projeto foi, previamente, aprovado pela Comissão de Ética médica do HC/UNICAMP.

3.2 Pacientes: Os pacientes tinham diagnóstico de Tuberculose pulmonar definida por baciloscopia (BK+) ou cultura. As formas clínicas escolhidas para este estudo foram as seguintes: pacientes que pela primeira vez haviam contraído tuberculose, chamados “virgens” de tratamento (VT) e pacientes crônicos, isto é, sob tratamento por tempo muito superior ao habitual, denominados refratários ao tratamento (RT), acompanhados nos ambulatórios do Instituto de Tisiologia “Clemente Ferreira”, Centro de Referência do Estado de São Paulo. Foram estudados 59 pacientes, 28 eram VT, sendo 13 do sexo feminino e 15 do sexo masculino, 35 eram RT, sendo 14 do sexo feminino e 21 do sexo masculino, e 14 indivíduos Normais, sendo 11 do sexo feminino e 03 do sexo masculino. Nos três grupos, a idade variou entre 20 e 70 anos. A média de idade, por grupo, foi: VT - 30 anos, RT - 36,7 anos e Normais - 26 anos. Os dados dos pacientes estão nos quadros Ia e Ib do apêndice.

No quadro III, apresentado no apêndice, mostramos os dados dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar (VT e RT) quanto à baciloscopia (BK), teste anti-HIV e cultura. Dos 28 pacientes VT estudados, somente um não tinha BK positivo; quanto ao teste anti-HIV, 21 eram negativos e, em sete, não foram encontrados os registros dos resultados. Quanto aos 35 pacientes estudados do grupo RT, 33 tinham BK positivo e dois, BK negativo; no teste de anti-HIV, 25

apresentaram resultado negativo e 10 não tinham o resultado registrado. O tempo médio de doença neste grupo foi de 6,8 anos.

Quadro I. Distribuição dos pacientes estudados de acordo com o diagnóstico clínica.

Grupos Clínicos	Nº de Pacientes
“Virgens” de tratamento (VT)	24
Refratários ao Tratamento (RT)	35
TOTAL	59

3.3 Indivíduos controles: O grupo controle foi composto de indivíduos saudáveis, selecionados entre os alunos e funcionários da UNICAMP.

3.4 Reagentes: Para a quantificação dos níveis de TGF- β os seguintes anticorpos foram utilizados: anticorpo policlonal anti-TGF- β humano, obtido em galinha (R&D, USA), anticorpo monoclonal anti-TGF- β bovino, obtido em camundongo (Genzyme, MA, USA), anti-IgG de camundongo marcado com biotina (Vector, lab. USA). Com relação às dosagens de IFN γ empregamos os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-HU INF- γ (HB8700) e anticorpo monoclonal anti-IFN- γ humano marcado com biotina (Pharmingen, CA, USA). Para a construção das curvas empregamos IFN- γ recombinante humano (Pharmingen, CA, USA) e TGF- β humano purificado (Genzyme, MA, USA).

3.5 Obtenção de células mononucleares a partir do sangue

periférico humano: Foi coletado sangue periférico de indivíduos normais e infectados utilizando tubos Vacutaner (@), siliconizado, heparinizado e estéreis. As células mononucleares foram separadas em gradiente de Ficoll-Hipaque com densidade de 1077. Após a centrifugação o anel linfocitário foi colhido com pipeta Pasteur e lavado por três vezes com HBSS e posteriormente suspenso em meio de cultura. Os linfócitos foram contados em câmara hemocitométrica ajustando-se a concentração celular conforme os experimentos realizados.

3.6 Cultura de células mononucleares do sangue periférico

humano: Células obtidas, de acordo com o item anterior, foram ajustadas para 2×10^5 células por poço, em placas de cultura de 96 poços, num volume de 200 μ l de RPMI 1640 (Sigma Chemical Co-USA) suplementados com 10% de soro AB humano, penicilina(100 μ g) garamicina(5mg/ml), estreptomicina (100 U/ml), 25 mM de HEPES (Sigma Chemical Co-USA). Os ensaios foram realizados em triplicata. Avaliamos a transformação blástica de linfócitos estimulados com PHA, PPD e MT. As células foram incubadas por 72 horas com o mitógeno e 96 horas com antígenos específicos, em incubadora contendo tensão constante de 5% CO₂ a 37°C. As concentrações ótimas tanto do mitógeno como dos antígenos foram determinadas previamente, sendo que a concentração de 50 μ g/ ml foi utilizada tanto para PHA como para PPD e MT. Aproximadamente 18 horas antes do término do período de incubação, 1 μ Ci de timidina tritiada (New England Nuclear MA, USA) foi adicionado a cada poço. Após este período, o excesso de material radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor (Cell-Harvester Model 200A - Cambridge Technology, Inc.). As células livres do excesso de radioativo, foram depositadas em papel de fibra de vidro (Cambridge Technology, USA) e colocadas

em tubos padronizados contendo líquido de cintilação. O conteúdo radioativo foi determinado em cintilador beta (Beckman). Os resultados foram expressos em contagem por minuto (CPM) sendo considerada a média das triplicatas. A atividade supressora das prostaglandinas sobre a proliferação de linfócitos foi estudada no ensaio de blastogênese, através da adição de indometacina às culturas. A concentração ótima foi de 10^{-5} M de indometacina.

3.7 Produção de citocinas: Células do sangue periférico humano foram obtidas de acordo com item anterior, ajustadas para 2×10^6 /ml e cultivadas em placas de cultura de 24 poços. Para a produção de TGF β as células foram cultivadas em meio livre de soro (meio SF- Gibco, USA), de acordo com protocolo já empregado anteriormente (SANTOS et al., 1994) . O tempo ideal para a produção de IFN γ foi de 60 horas e 72 horas para TGF β . Após o período de incubação os sobrenadantes foram retirados e centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos e os níveis de citocinas quantificados utilizando-se o método de ELISA de captura.

3.8 Elisa de Captura: Para determinar os níveis de TGF β utilizamos o método de ELISA de captura empregado por Miller et al. 1993 O TGF- β consiste na família de citocinas que apresenta sequência de aminoácido muito bem conservadas filogeneticamente (FLANDERS et al., 1988; DANIELPOUR et al., 1989), permitindo o emprego de anticorpos de diferentes espécies nos ensaios imunoenzimáticos. Devido à estrutura molecular o TGF β apresenta-se na forma latente e ativa, sendo, a primeira, normalmente liberada pela células. A forma ativa do TGF β é normalmente obtida através de acidificação, e ação de enzimas proteolítica ou interação célula-célula (LYONS et al., 1988; LAWRENCE et al., 1985). Em termos de quantificação em ensaios imunoenzimáticos, ficou

demonstrado que apenas a forma ativa de TGF β tem capacidade de se ligar aos anticorpos (LUCAS et al., 1990). Para determinar os níveis de TGF- β utilizamos o método de ELISA de captura: os sobrenadantes obtidos de acordo com o item anterior foram acidificados com 10 μ l de HCL 1 N por 1ml de sobrenadante, durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguidos de neutralização com 10 μ l de NaOH 1 N. Após este tratamento, os sobrenadantes foram distribuídos nas microplacas de ELISA (Immulo I NUNC, Roskilde, Dinamarca) devidamente cobertas com os anticorpos. As microplacas de ELISA foram cobertas com 1 μ g/ml de anticorpo policlonal anti- TGF- β humano, obtido em galinha (R &D,CA, USA) em tampão carbonato 0.05M pH 9.6. Após 18 horas de incubação a 4⁰ C, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0.05% de Tween 20 e 0.01 de thimerosal. As reações inespecíficas foram bloqueadas com 200 μ l de BSA 3% em PBS, por duas horas a temperatura ambiente. Para a construção da curva padrão, utilizamos TGF- β humano purificado (Genzyme, MA, USA). O sobrenadantes e os padrões foram incubados por 18 horas a 4⁰ C. Após este tempo, as microplacas foram lavadas três vezes com PBS e adicionado o anticorpo monoclonal anti-TGF- β bovino obtido em camundongo (Genzyme, MA, USA), 2 μ g/ml diluído em PBS com 0.1% de BSA. As microplacas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente e lavadas após este tempo. Adicionou-se então anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com biotina (Vector lab., MA, USA), na diluição de 1:2000 e as placas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas e adicionou-se então avidina-peroxidase (Sigma-Chemical Co-USA) na concentração de 1:400 em PBS e 10% de soro bovino fetal. Após 30 minutos de incubação, o substrato contituído por 10 ng OPD (Sigma Chemical Co, USA), e mais 10 μ l de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical Co, USA), foi adicionado e procedida a leitura a 490 nm em leitor de Elisa Labsysten.

3.9 Dosagem de IFN γ : Para a quantificação de IFN γ as microplacas da mesma procedência descrita acima foram cobertas com 1 μ l de anticorpo monoclonal anti-HU INF- γ (HB8700) (Pharmingen, CA, USA) , em tampão carbonato pH 9,6 , por 18 horas.

As placas foram lavadas as reações específicas bloqueadas com BSA 3% em PBS por 2 horas a temperatura ambiente após este período o IFN γ humano recombinante (Pharmingen, CA, USA) foi adicionado em diferentes concentrações para a curva padrão, assim como os sobrenadantes. As amostras foram incubadas por 18 horas a 4⁰C. As placas foram lavadas e adicionado o anticorpo monoclonal anti-IFN γ humano marcado com biotina (Pharmingen, CA, USA). As placas foram incubadas por um período de 1 hora a temperatura ambiente. Após este período, as microplacas foram lavadas e adicionada avidina-peroxidase seguido de substrato e leitura, como descrito para TGF β .

3.10 Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia: Utilizamos o antígeno derivado proteico purificado (PPD) (Ataulfo de Paiva Ltda) , as leveduras (candidina e tricoftina) (Ataulfo de Paiva Ltda) e o composto químico dinitroclorobenzeno (DNCB 50 e 2000 μ g) (Ataulfo de Paiva Ltda). Para aplicação do PPD utilizamos a técnica do Mantoux, que consiste da injeção intradérmica de 0,1ml e os antígenos candidina e tricoftina foram aplicados por injeção intradérmica na região deltóide sendo que a leitura foi a mesma que a do mantoux. As medidas da área de endureção foram realizadas 72 horas após aplicação. A reação foi considerada positiva quando houve endureção com diâmetro maior ou igual a 5 mm (SPITLER, 1976).

Foram aplicados os discos de feltro do DNCB nas dosagens de 2000 e 50 μ g sobre a pele na região dorsal superior e fixadas com micropore por 24 horas. Após

14 dias , foi observada as reação inflamatória local. Na data da leitura foi aplicada nova dose de 50 μ g de DNCB, em lado contra lateral, e observadas as reações de eritema e enduração após 72 horas (CATALONA et. al 1972).

3.11 Testes estatísticos: Teste de Friedman: teste não paramétrico para mais de dois grupos relacionados (LEVIN,1987) utilizado para comparar o efeito dos diferentes antígenos sobre a resposta linfoproliferativa e nos ensaios imunoenzimáticos. Nos casos em que resultou estatística significativa, o teste de Friedman foi complementado com teste de Wilcoxon, teste não paramétrico utilizados para comparar dois grupos de amostras relacionadas. O nível de significância foi $\alpha=0,05$ para todos os testes empregados.

IV - RESULTADOS

4. 1 Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia

Na tabela I estão representados os resultados dos testes cutâneos de hipersensibilidade tardia do grupo de pacientes estudados. Com relação ao estímulo com PPD a tabela I também mostra os valores obtidos em indivíduos normais. Podemos observar que houve resposta fortemente positiva para PPD nos grupos dos pacientes VT 90% e RT 96% e somente um indivíduo de cada grupo teve reação fracamente positiva PPD=5, enquanto o grupo de indivíduos normais mostrou 36% de positividade. Com relação às duas leveduras (candidina e a tricoftina) a porcentagem de positividade foi baixa nos dois grupos estudados, (candidina=VT 70% e RT 66,6%; tricoftina= VT 90% e RT 83,3%) de resultados negativos. Com relação ao DNCB 62% dos pacientes refratários e 25% dos “virgens” de tratamento apresentaram resultados negativos.

Tabela I. Testes cutâneos de leitura tardia. Resultados expressos em mm.; sensibilização ao DNCB: Resultado negativo (neg) ou positivo (+). Combinação dos resultados dos dois grupos de pacientes.

Antígenos	VT			RT		
	<5mm	5 a 9	>10	<5mm	5 a 9	>10
PPD	0/12	1/12	11/12	0/18	1/18	17/18
Candidina	3/10	5/10	2/10	7/18	5/18	4/18
tricoftina	4/10	5/10	1/10	7/18	7/18	0/18
DNCB	3(neg)/9	6(+)/9		10neg/16	6(+)/16	
PPD-Normal	6/13	1/13	6/13			

4.2 Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (“virgens e refratários ao tratamento) e do grupo de indivíduos normais, estimulados com PPD, MT e PHA

A ativação ou transformação linfocitária refere-se a um processo “in vitro” que se correlaciona ao processo que regularmente ocorre quando linfócitos do hospedeiro, especificamente sensibilizados, interagem com o antígeno. É a técnica mais comumente usada para avaliar a imunidade celular. Mitógenos como a PHA, são estimulantes policlonais e não requerem sensibilização prévia do indivíduo como no caso de antígenos específicos PPD e MT. Com a finalidade de avaliar a resposta imune celular inespecífica e específica ao antígeno da *Mycobacterium tuberculosis*, utilizamos linfócitos do sangue periférico dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar (VT e RT) e do grupo de indivíduos normais e estimulamos com PPD, MT e PHA.

Na figura 1, encontram-se os resultados da resposta proliferativa de linfócitos de pacientes portadores de Tuberculose pulmonar (VT e RT) e de indivíduos normais, estimulados com PHA. Pode se observar que a variação de resposta entre os indivíduos estudados é grande. Mesmo com essa variação, observou-se significativa redução da resposta blastogênica dos dois grupos de pacientes estudados quando comparados ao grupo de indivíduos normais (VT= $P=0.001$ e RT= $P= 0.003$). Não houve diferença significativa entre a resposta proliferativa dos indivíduos do grupo VT e RT ($p>0.05$).

Na figura 2 estão os resultados de resposta proliferativa dos indivíduos dos 3 grupos estudados, estimulados com PPD. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre a resposta blastogênica apresentada pelo grupo de indivíduos normais e o de pacientes “virgens de tratamento” ($p>0.05$). O grupo de

indivíduos normais e o de pacientes “virgens de tratamento ($p>0.05$). O grupo de indivíduos refratários ao tratamento apresentou resposta significativamente maior que o grupo de indivíduos normais ($p= 0.001$)

Na figura 3 encontram-se os resultados obtidos quando se avaliou a proliferação de linfócitos frente ao extrato bruto de *Mycobacterium tuberculosis* (MT) nos três grupos estudados. Os dados revelam que o grupo de indivíduos normais apresentou resposta proliferativa significativamente maior que as apresentadas no grupo de indivíduos VT ($p=0.006$). No grupo de pacientes “virgens” de tratamento, a resposta proliferativa de linfócitos é significativamente reduzida quando comparada aos grupos de indivíduos RT ($p=0.006$). No entanto, o grupo de indivíduos normais em relação ao grupo de indivíduos RT não apresentou resultado significativo ($p>0.05$).

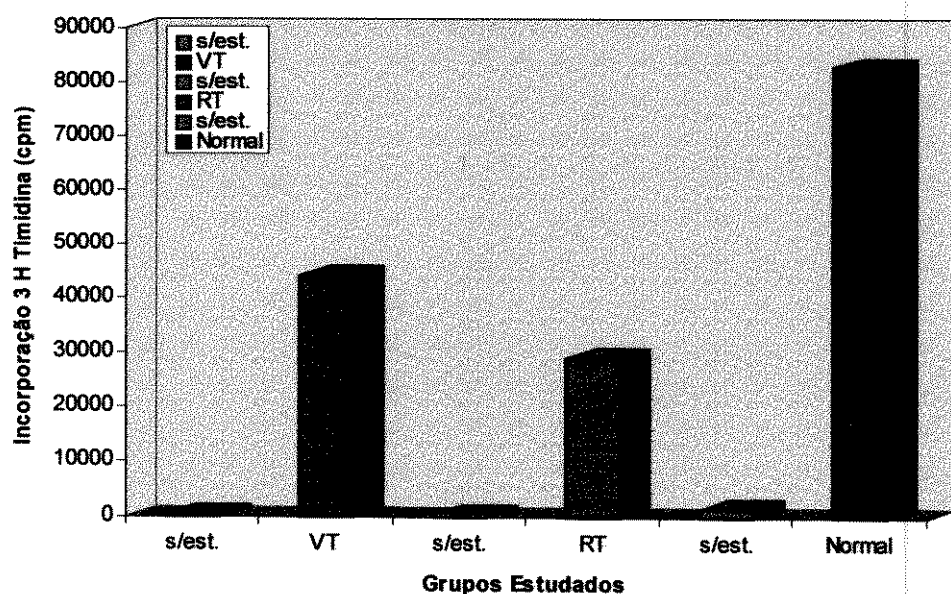
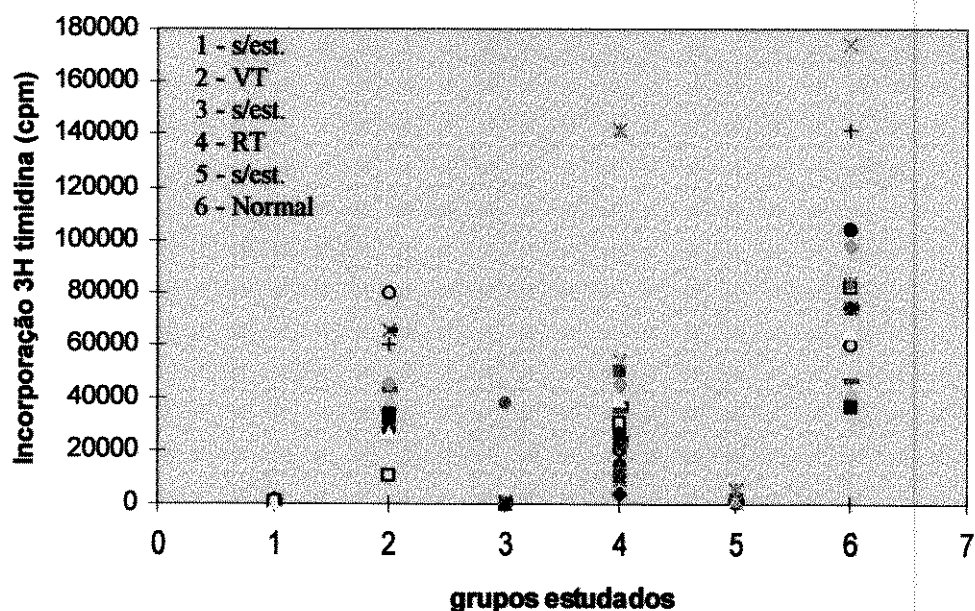


Figura 1. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados por PHA (50 μ g/ml). Resultados expressos em contagens por minuto (cpm). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

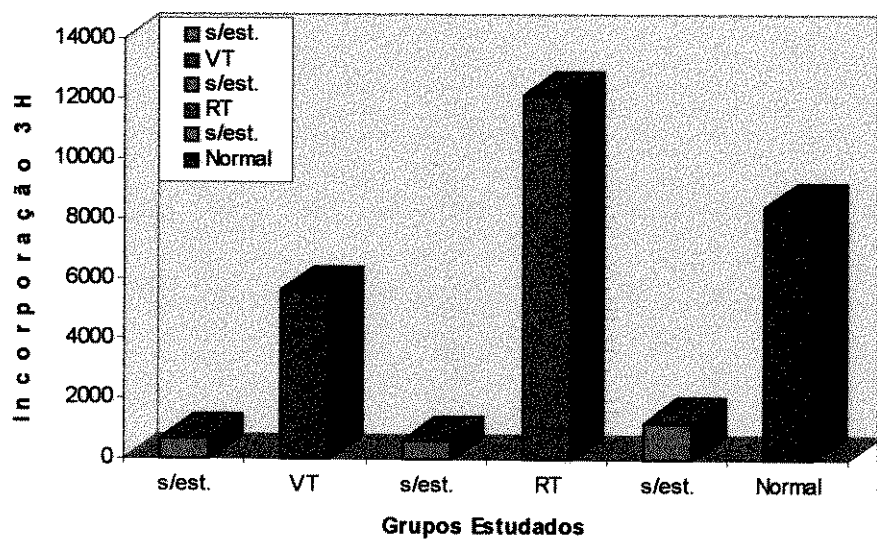
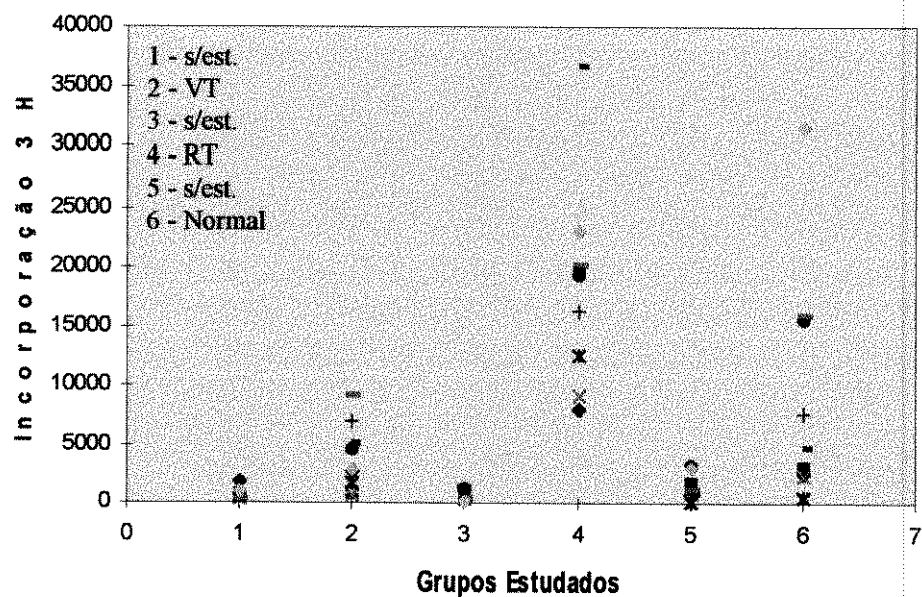


Figura 2. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e de indivíduos normais estimulados com PPD (50 $\mu\text{g/ml}$). Resultados expressos em contagens por minuto (cpm). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

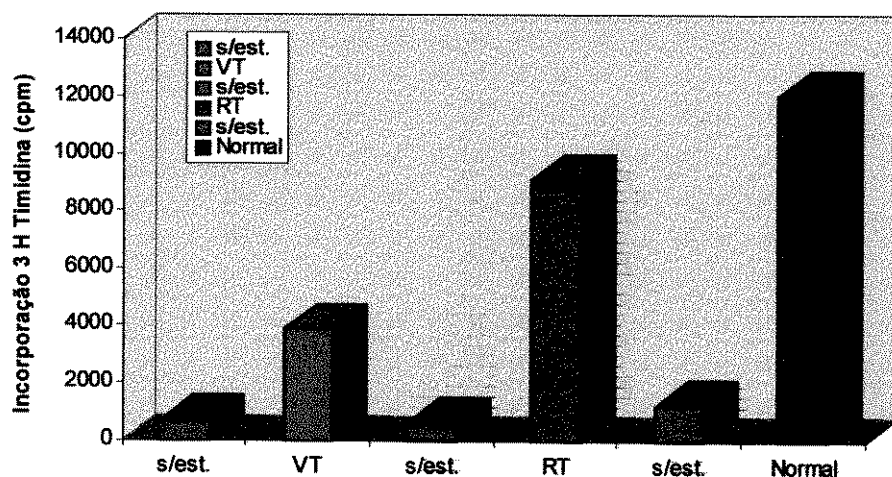
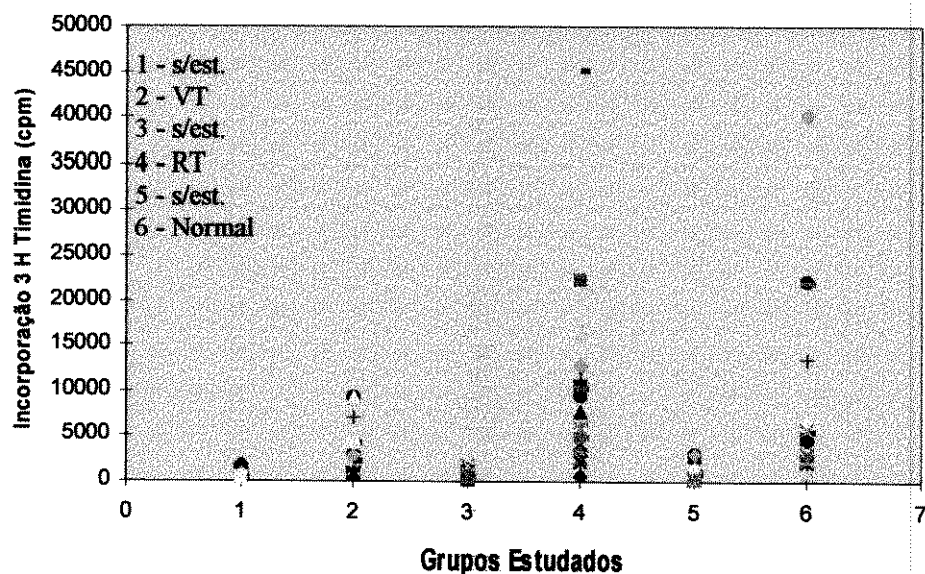


Figura 3. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados por MT H37Ra (50 µg/ml). Resultados expressos em contagens por minutos (cpm). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

4.3 Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes portadores de tuberculose pulmonar refratários ao tratamento cultivados na presença de indometacina.

A interação de linfócitos com as células do sistema monocítico-fagocitário envolve mecanismos muito complexos. Citocinas produzidas pelos macrófagos, por exemplo, tanto agem inibindo como estimulando a população linfocitária. As prostaglandinas E2 são conhecidas pela a propriedade de inibir a resposta blastogênica de linfócitos. A Indometacina atua inibindo a via da ciclooxygenase no metabolismo do ácido araquidônico, suprimindo, portanto, a síntese das prostaglandinas. Este grupo de experimentos foi idealizado com a finalidade de verificar se a supressão da resposta proliferativa de linfócitos dos pacientes com tuberculose refratários ao tratamento era devida à excessiva produção de PGE₂. Desta forma, as células dos indivíduos foram cultivadas na presença de Indometacina.

Os resultados expressos na figura 4 mostram que houve discreto aumento da resposta blastogênica dos linfócitos estimulados tanto por PHA, como por PPD e MT, quando cultivados na presença de Indometacina. Embora, estes valores tenham atingido significância estatística ($p < 0.05$), observamos que o aumento é muito discreto, não revertendo a resposta blastogênica dos pacientes ao nível da resposta dos indivíduos normais.

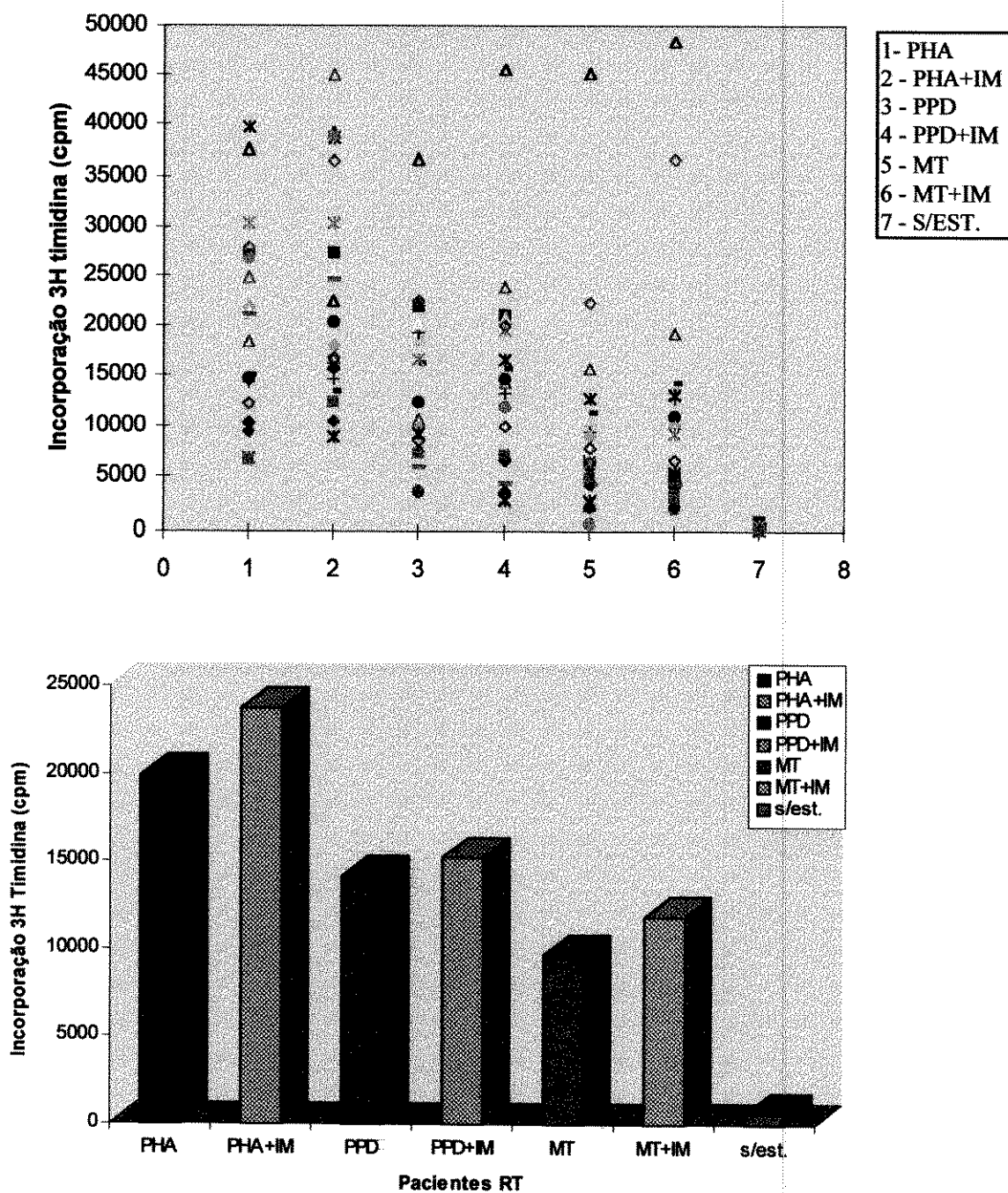


Figura 4. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose RT estimulados por PHA, PPD e MT H37Ra, testados com indometacina (IM). Resultados expressos em contagens por minuto (cpm). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

4. 4 Produção de TGF- β por células do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar e indivíduos normais, após o estímulo com PHA, PPD e Mt

O fator transformador de proliferação β faz parte de uma família de citocinas com propriedades pró e anti-inflamatórias. A redução da resposta blastogênica de linfócitos pelo TGF β está bem descrita na literatura. Com o objetivo de verificar se a diminuição da resposta blastogênica de linfócitos do grupo de pacientes foi devido ao aumento na produção de TGF β , os linfócitos do sangue periférico foram estimulados com PHA, PPD e MT em cultura, e os níveis de TGF β do sobrenadante foi dosado nos três grupos.

Analizando os resultados apresentados na figura 5, verificamos que a produção de TGF- β quando as células foram estimuladas com PHA, não chegou, a atingir valores significativos entre os grupos estudado ($p > 0.05$), apesar estar aumentada no grupo RT.

Quando as células foram cultivada e estimuladas com PPD, observou-se aumento na produção de TGF β no sobrenadante de cultura de indivíduos RT, quando comparados aos normais ($p=0.03$), enquanto que não se observou aumento no sobrenadante dos indivíduos VT relacionados com normais ($p>0.05$) como mostra a figura 6.

A figura 7 mostra a produção de TGF- β no sobrenadante de células linfocitárias estimulados com o extrato bruto de *M. tuberculosis* MT. Os resultados mostram que a produção do TGF β foi maior nos indivíduos RT quando comparados aos normais ($p=0,01$) Também houve aumento da produção de TGF- β no grupo de indivíduos VT quando comparados ao grupo de indivíduos os normais ($p=0.02$). Observando os níveis de TGF- β do grupo de células que não foram estimuladas

nota-se que os níveis de citocinas são consideráveis. Como mencionamos, TGF- β é produzido na forma inativa e necessita de ativação prévia para se transformar na forma ativa. Para o ensaio imunoenzimático fizemos tratamento com ácido para transformar TGF- β latente na forma ativa. Este tratamento implicou em alterar todas as moléculas de TGF- β , explicando, portanto, os níveis altos obtidos nos sobrenadantes de células não estimuladas.

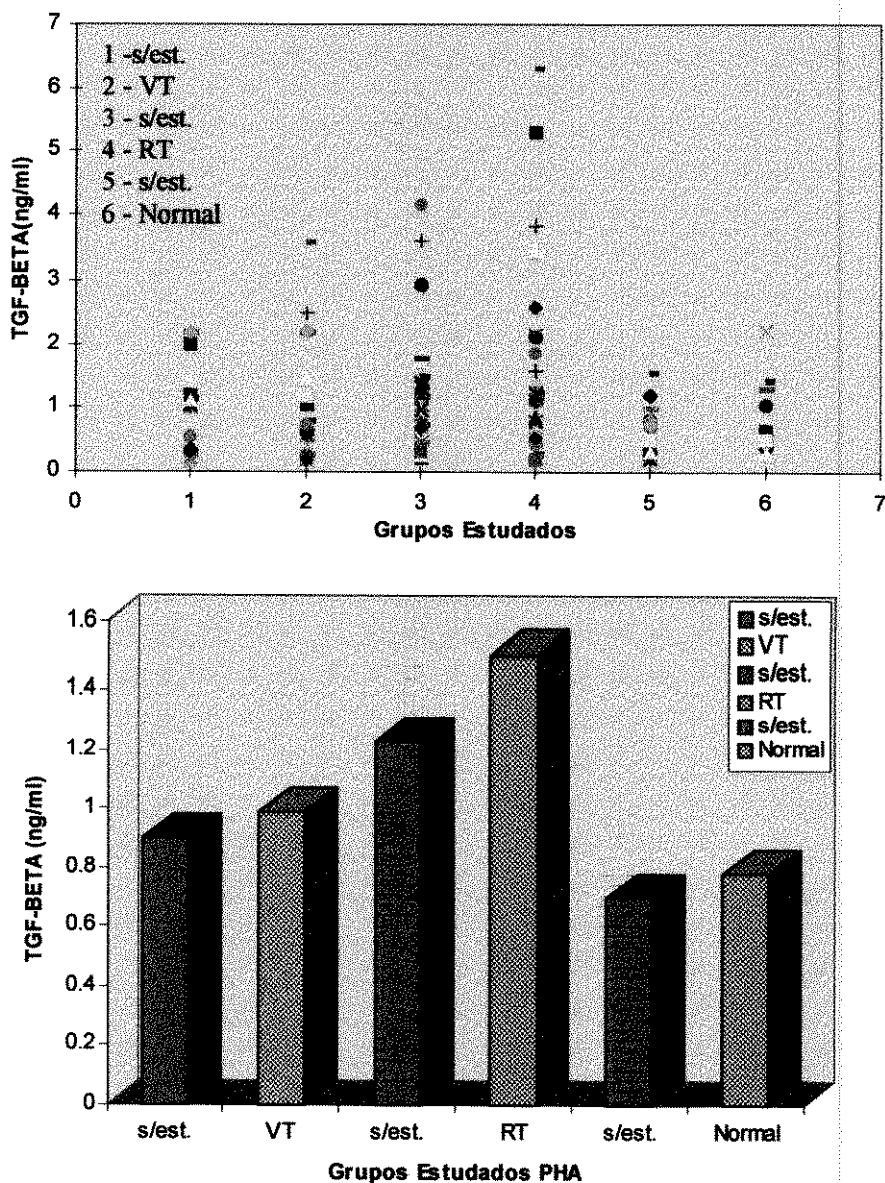


Figura 5. Níveis de TGF β no sobrenadante de células linfocitárias do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais, na presença e ausência de estímulo com PHA. Os níveis de TGF β foram quantificados utilizando-se o método de ELISA de Captura. Resultados expressos em nanograma por mililitro (ng/ml). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

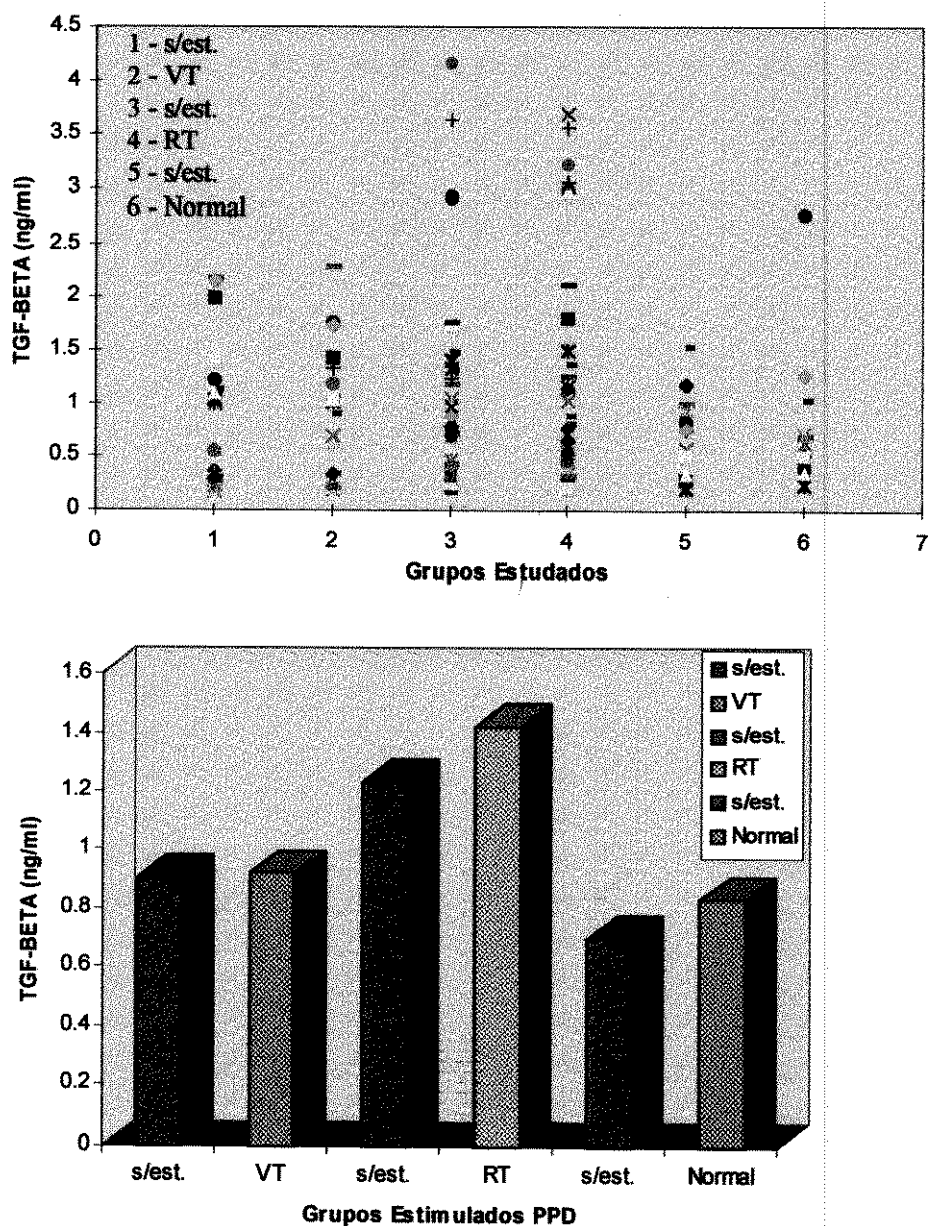


Figura 6. Níveis de TGF β no sobrenadante de células linfocitárias do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais na presença e ausência de estímulo com PPD. Os níveis de TGF β foram quantificados utilizando-se o método de ELISA de Captura. Resultados expressos em nanograma por mililitro (ng/ml). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

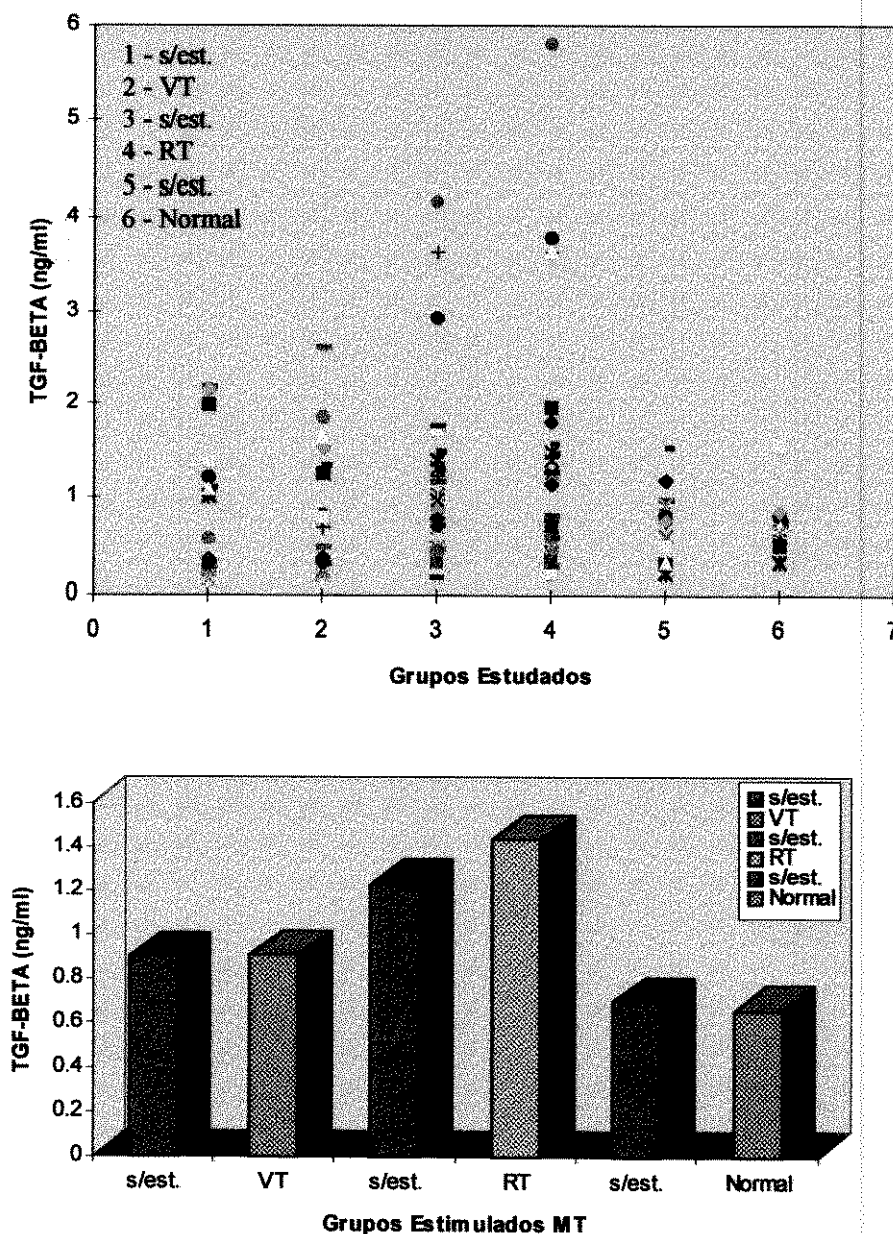


Figura 7. Níveis de TGF β no sobrenadante de células linfocitárias do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais na presença e ausência de estímulo com MT H37 Ra. Os níveis de TGF β foram quantificados utilizando-se o método de ELISA de Captura. Resultados expressos em nanograma por mililitro (ng/ml). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

4.5 Produção de IFN- γ por células leucocitárias de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (VT e RT) e indivíduos normais, após estímulo com PHA, PPD e MT.

Entre as citocinas envolvidas na infecção com o *M. Tuberculosis*, o IFN- γ ocupa posição de destaque principalmente no que diz respeito à ativação de células do sistema monocítico-fagocitário. A importância do envolvimento do IFN γ nos mecanismos de proteção contra infecções por bactérias intracelulares é amplamente descrita na literatura.

Baseados nestes dados, foram efetuados experimentos no sentido de verificarmos a produção de IFN γ por linfócitos de pacientes portadores de Tuberculose pulmonar, nos grupos VT e RT e indivíduos normais quando estimulados com PHA, PPD e MT. Foi quantificado IFN- γ do sobrenadante de cultura, nos três grupos.

Na figura 8 estão os resultados dos níveis de IFN- γ produzidos por linfócitos estimulados com PHA. Observou-se que o grupos de pacientes (VT e RT) produziram níveis IFN- γ ligeiramente superior os de indivíduos normais, todavia não foi possível detectar significância estatística entre os grupos ($p > 0.05$).

Não houve redução significativo da produção de IFN- γ , em nenhum dos grupos estudados, quando as células foram estimuladas pelo antígeno específico PPD ($p > 0,05$), (figura 9).

A figura 10 apresenta os resultados da produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células que foram estimuladas com MT. A produção de IFN- γ foi significativamente menor no grupo de pacientes quando se comparou indivíduos normais ($p = 0,005$) o mesmo se observou para os pacientes "virgens" ($p = 0,0001$).

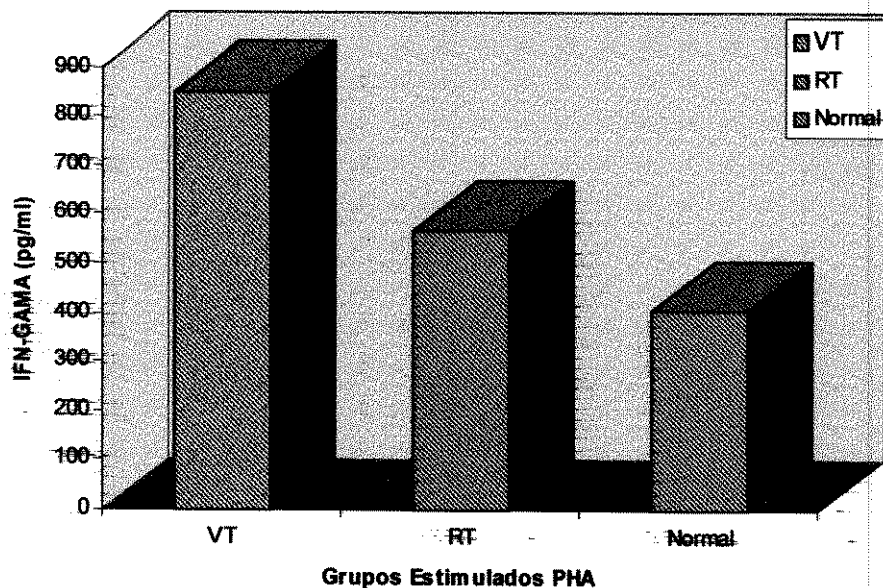
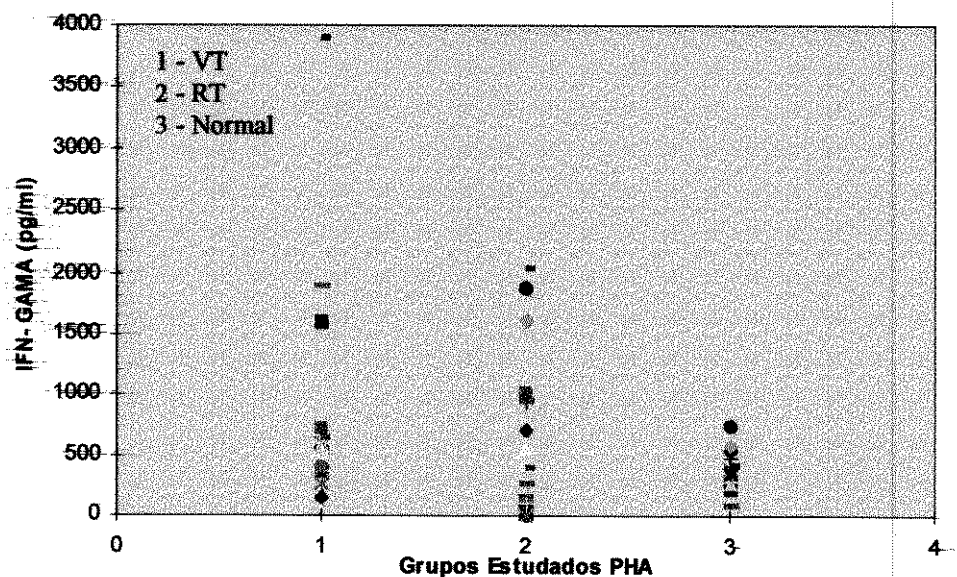


Figura 8. Níveis de IFN γ produzidos por linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados com PHA. Os níveis de IFN γ nos sobrenadantes de cultura foram quantificados pelo ensaio or ELISA de captura. Resultados expressos em picograma por mililitro (pg/ml). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

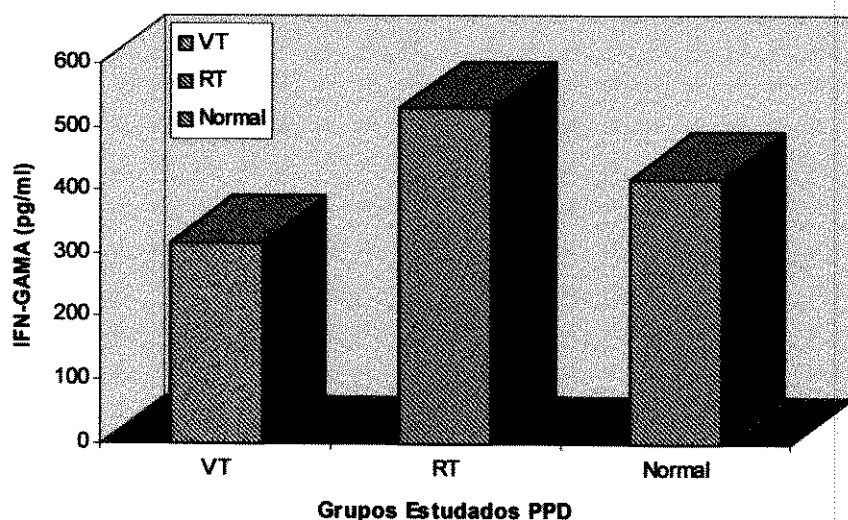
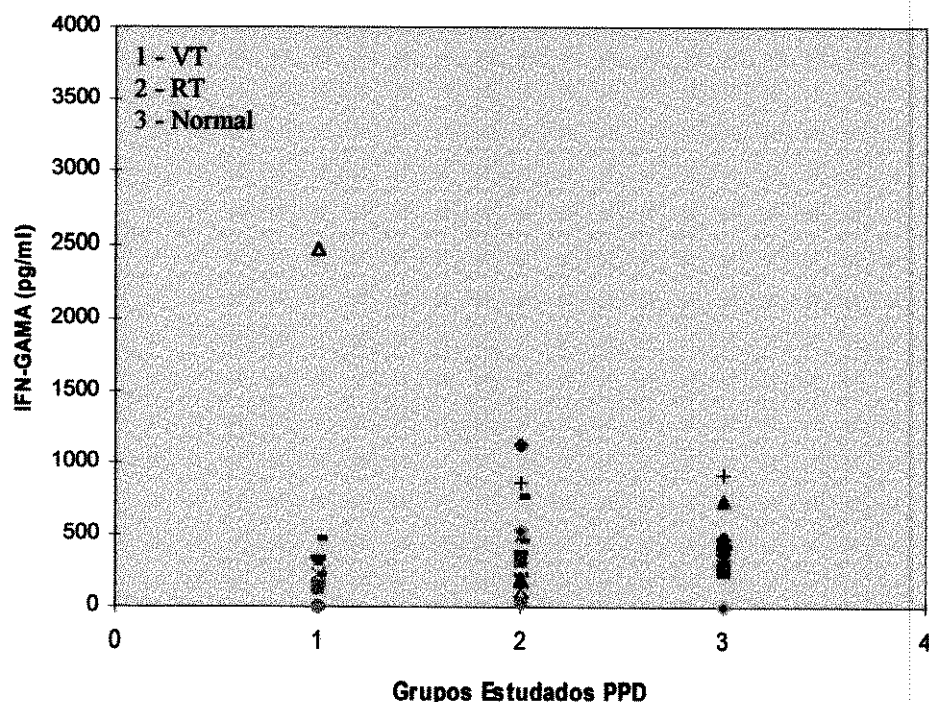


Figura 9. Níveis de IFN γ produzidos por linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados com PPD. Os níveis de IFN γ nos sobrenadantes de cultura foram quantificados pelo ensaio por ELISA de captura.. Resultados expressos em picograma por mililitro (pg/ml). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

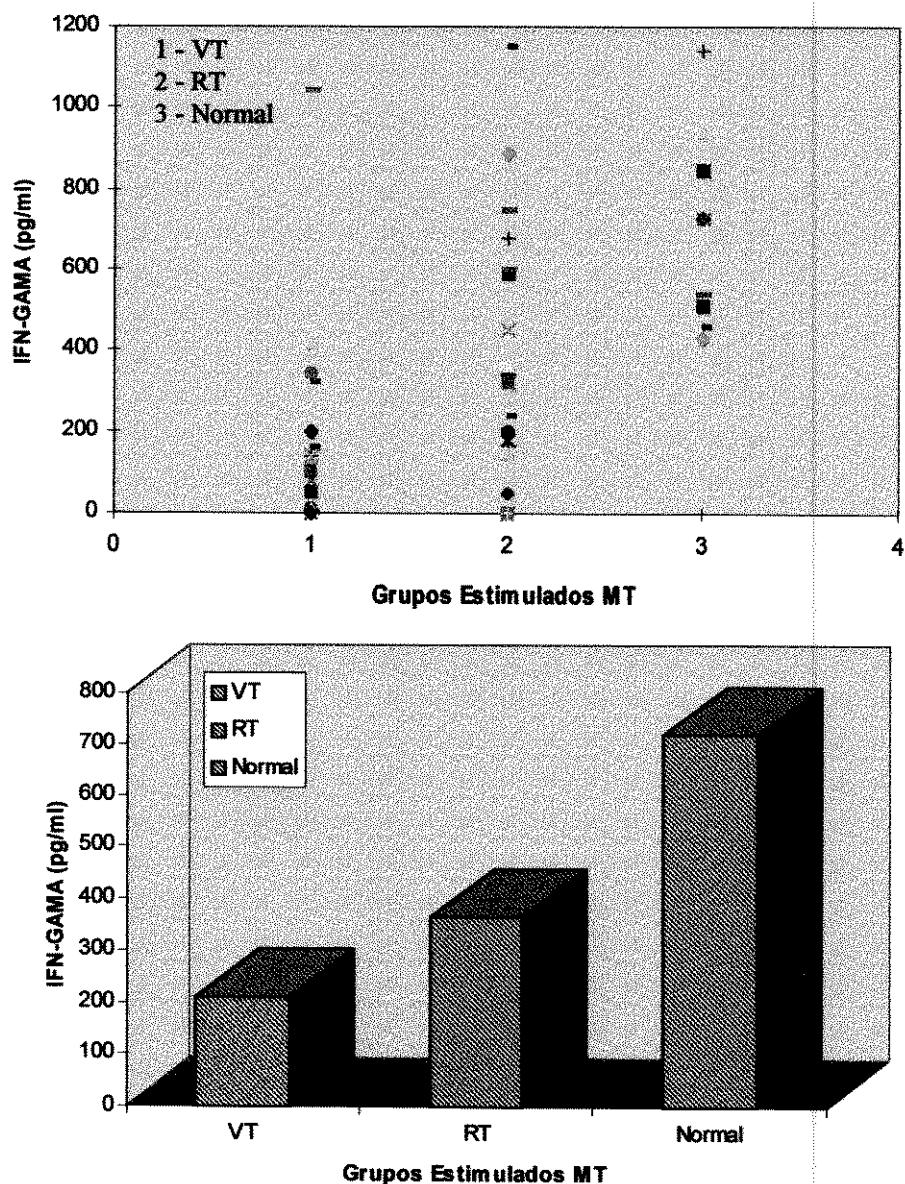


Figura 10. Níveis de IFN γ produzidos por linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados com MT H37Ra. Os níveis de IFN γ nos sobrenadante de cultura foram quantificados pelo ensaio por ELISA de captura.. Resultados expressos em picograma por microlitro (pg/ml). Gráfico superior populações; gráfico inferior, valores médios.

V- DISCUSSÃO

As doenças crônicas causadas por parasitas intracelulares dependem da relação que o agente agressor mantém com o hospedeiro. A imunidade celular é o braço da resposta imune mais eficiente no controle de parasitas intracelulares como o *Mycobacterium tuberculosis*. Falha em um ou mais mecanismo dessa imunidade, fatalmente leva à maior replicação do microrganismo, tornando se muito difícil o controle, mesmo com as terapias estabelecidas.

No presente trabalho estudamos alguns parâmetros da resposta imune celular de indivíduos portadores de Tuberculose pulmonar “virgens” e refratários ao tratamento, comparados aos de indivíduos normais.

A resposta imune-celular “in vivo” foi avaliada nos três grupos de indivíduos, através da realização de testes cutâneos de leitura tardia. Indivíduos saudáveis, com a resposta imune preservada respondem na ordem de 90 a 96% às leveduras como tricofitina e levedurina e à sensibilização cutânea ao DNCB (MUSATTI et al., 1976). Verificamos que nos dois grupos de pacientes estudados a percentagem de negatividade foi alta para os testes com antígenos derivados de leveduras. Com relação à sensibilização cutânea ao DNCB, 62% dos pacientes RT apresentaram resultados negativos, enquanto que o grupo de pacientes VT mostrou moderada supressão da resposta imune celular, com 63% de positividade.

Os dois grupos de pacientes apresentaram alta porcentagem de resposta positiva ao PPD. Com relação à resposta ao PPD pelos indivíduos normais, embora o grupo controle estudado seja muito pequeno, nossos dados estão em acordo com a literatura. Por um lado, temos indivíduos fracamente reativos, escolhidos entre os alunos da Universidade e por outro, indivíduos normais fortemente reativos, caracterizando o grupo de funcionários do HC- UNICAMP.

A correlação entre a hipersensibilidade ao PPD e a resposta imune protetora na Tuberculose pulmonar tem sido motivo de muitos estudos e muita controvérsia. Alguns autores tentam correlacionar o grau de resposta imune protetora ao teste de

hipersensibilidade; o mantoux positivo também não indica a presença de imunidade protetora, no entanto, nossos dados mostram que esta correlação é no mínimo perigosa. Devido à imunização em massa da população em nosso meio, os indivíduos normais tendem a apresentar alta percentagem de positividade ao teste. Devemos considerar ainda que uma certa percentagem de indivíduos com formas graves da doença apresentam anergia ao teste (LENZINI et al., 1977). O teste positivo deve ser entendido, portanto, como indicador de infecção prévia e não necessariamente refletindo doença.

A imunidade celular dos pacientes e grupo-controle foi avaliada também "in vitro". A ativação linfocitária "in vitro" tem sido utilizada há décadas para avaliar a imunidade celular dos indivíduos (MUSATTI et al., 1976). A resposta proliferativa de linfócitos reproduz os eventos que normalmente ocorrem "in vivo", quando os linfócitos sensibilizados interagem com antígeno. Por medir a capacidade funcional dos linfócitos é um teste de escolha, pois oferece mais informação que a mera fenotipagem das sub-populações celulares.

A transformação blástica de linfócitos dos três grupos de indivíduos foi estudada, tanto em resposta a mitógeno inespecífico como aos antígenos específicos. Pôde-se observar que há uma variação muito grande na resposta individual tanto dos pacientes como dos indivíduos normais. Essa variabilidade é inerente a estudos clínicos desta natureza, devido às diferenças entre os indivíduos, em termos de gravidade e tempo de doença, padrão genético, nutricional, etc. Com relação ao estímulo com PHA, mostramos que os dois grupos de pacientes apresentaram resposta blastogênica suprimida, quando comparada ao grupo controle normal. A resposta proliferativa do grupo de pacientes RT se mostrou mais deprimida que dos grupo VT. Estes dados estão coerentes com a clínica destes pacientes.

Quando se avaliou a resposta proliferativa de linfócitos dos pacientes frente aos antígenos específicos como o derivado protéico purificado (PPD), verificou-se

que o grupo de pacientes RT apresentou resposta significativamente aumentada quando comparada ao grupo normal, enquanto não se observou diferença significativa entre o grupo de pacientes VT e os normais. Com relação ao estímulo com extrato bruto de *M. tuberculosis* (MT), o grupo de indivíduos normais apresentou resposta significativamente maior que a dos pacientes VT, não havendo diferença entre o grupo de pacientes RT e o indivíduos normais. Nossos dados mostraram por um lado, depressão da resposta imune global dos pacientes, e por outro, relativo aumento da resposta aos antígenos específicos. O aumento da resposta específica observada principalmente no grupo de pacientes RT, pode ser explicada pela permanência do antígeno, diante da cronicidade da doença. Os antígenos derivados de MT estão entre os mais potentes mitógenos para os linfócitos T, principalmente as células CD4. A presença do antígeno no organismo mantém um contingente maior de linfócitos sensibilizados circulantes; desta forma, ao serem colocados em cultura, temos uma percentagem maior de linfócitos sensibilizados respondendo aos antígenos “in vitro”.

São dignos de nota os resultados apresentados pelos indivíduos normais quando em contato com antígenos derivados de MT. Observamos que, a exemplo do que ocorre para o teste de hipersensibilidade ao PPD os indivíduos normais apresentam uma importante resposta proliferativa. Estes dados não concordam com os obtidos por Johnson & McMurray 1994, que não observaram resposta blastogênica de linfócitos de indivíduos normais estimulados com PPD “in vitro”. Como já mencionamos, em nosso meio, provavelmente devido à vacinação em massa e a maior prevalência da doença, é compreensível que os indivíduos normais apresentem células sensibilizadas. Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Surcel e colaboradores em 1994, que não observaram diferença significativa, em termos de proliferação, entre o grupo de pacientes com Tuberculose e o indivíduos normais, utilizando dois fragmentos antigênicos do PPD.

A composição antigênica do MT é muito complexa. Uma série de trabalhos vem demonstrando que diferentes antígenos estimulam diferentes populações celulares, podendo resultar tanto na potencialização como na depressão da resposta imune. Trabalhando no modelo de encefalomielite experimental auto-imune, os autores demonstraram que na molécula da Proteína Básica de Mielina foi possível identificar epitopos que ativam a supressão da resposta imune e consequentemente protegem os animais da doença, enquanto outros determinantes não apresentavam essa propriedade (MILLER et al., 1993). Carbohidratos, glicolípidos e proteínas componentes das micobactérias também podem atuar como importantes indutores de imunossupressão. Foi previamente descrita a existência do heteropolissacarídeo (LAM) constituinte da parede celular da micobactéria, que inibe de forma acentuada a resposta proliferativa de linfócitos, associado ao aumento da produção de IL-10 (MORENO et al., 1988; BARNES et al., 1992). Em trabalho em andamento em nosso laboratório demonstramos que a inoculação de 30µg/ml de MT, PPD ou peptídeo derivado de PPD leva a supressão de resposta proliferativa de linfócitos de camundongos SJL normais, associada a redução da severidade da encefalomielite experimental auto-imune (DIAZ-BARDALES et al., 1996)

A imunossupressão causada pelos monócitos tem importante papel na depressão da resposta imune observada nos pacientes portadores de tuberculose. Pacientes com tuberculose normalmente apresentam uma relativa monocitose. Foi previamente demonstrado o aumento de aproximadamente duas vezes o número de monócitos de pacientes, quando comparado aos indivíduos normais, utilizando-se o método de coloração da esterase. A resposta anérgica dos pacientes, identificada pela baixa resposta proliferativa de linfócitos e deficiente produção de IL-2, foi parcialmente revertida pela depleção dos monócitos (FUJIWARA et al., 1986).

Vários estudos têm demonstrado que os antígenos derivados de MT exercem seu efeito inibidor através da estimulação de macrófagos, induzindo-os a

produzirem citocinas com efeito depressor da resposta imune. Toossi e colaboradores mostraram que a atividade de IL-2 de células de pacientes portadores de tuberculose, estimuladas por PPD, estava 50 vezes menor que atividade em indivíduos normais. A depleção de monócitos do sangue periférico aumentou parcialmente a atividade de IL-2 dos pacientes. A prostaglandina E2, produzida pelas células do sistema fagocítico-monocitário, é conhecida pela propriedade de inibir a resposta blastogênica de linfócitos (GOODWIN et al., 1978; SANTOS et al. 1990). No sentido de verificar se a supressão da resposta de linfócitos, que observamos nos pacientes com tuberculose pulmonar, era devida a aumento na produção de PGE2, as células foram cultivadas na presença de indometacina, um bloqueador da via da ciclo-oxigenase do metabolismo do ácido araquidônico. Verificamos que a adição de indometacina às células de alguns pacientes levava um moderado aumento da resposta proliferativa, não revertendo aos níveis de normalidade. Essas observações estão em acordo com Apt e colaboradores em 1991 os quais observaram que os macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose são altamente supressores da resposta proliferativa de linfócitos e que sua supressão era em parte devida ao aumento da produção de PGE2, induzida pelo estímulo do PPD.

O fato de a resposta linfoproliferativa não ser totalmente restaurada pela indometacina indica que a supressão não específica da resposta imune não pode ser atribuída somente ao aumento da síntese das prostaglandinas. Outras citocinas produzidas tanto por macrófagos, como por linfócitos também estão envolvidas na regulação negativa da imunidade. O TGF- β faz parte de um família de citocinas conhecida pela ação pró e anti-inflamatória. O TGF- β é produzido por linfócitos T, B, macrófagos, plaquetas, célula epiteliais etc (ASSOIAN et al., 1987; MILLER et al., 1992). A depressão da resposta blastogênica de linfócitos é um dos principais efeitos anti-inflamatórios do TGF- β (KEHRL et al., 1991). A participação do TGF- β na supressão da resposta proliferativa de linfócitos dos pacientes foi investigada.

Verificamos que houve aumento significativo da produção de TGF- β pela células dos pacientes do grupo refratário ao tratamento, enquanto o grupo “virgens” de tratamento apresentou níveis comparáveis ao controle normal. Observou-se que até as células não estimuladas pelos antígenos ou mitógenos também secretaram altos níveis de TGF- β . Esses dados podem ser explicados pela natureza da molécula de TGF- β , que pode ser encontrada na forma ativa ou latente, sendo que a forma latente pode ser ativada por uma série de mecanismos; apenas as moléculas ativadas tem função biológica. Para a quantificação em ensaios imuno-enzimáticos é necessário que se faça uma acidificação prévia da molécula de TGF- β , um vez que somente a forma ativa tem a propriedade de se ligar aos anticorpos (LUCAS et al., 1990). Assim, os níveis altos de TGF- β observados na ausência de estímulos podem ser entendidos como a ativação da molécula que normalmente existe na forma latente. Nossos dados estão em acordo com TOOSSI et al., 1995 e BERMUDEZ, 1993 que mostraram aumento da produção de TGF- β por monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, quando essas células foram estimuladas com PPD. O aumento da produção de TGF- β , inclusive inibindo o efeito microbicida dos macrófagos, foi descrito em outras infecções por parasitas intracelulares com *Leishmaniose* (BARRAL-NETO et al., 1994) e *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 1991).

Paralelamente ao efeito anti-inflamatório, não se pode ignorar o efeito pró-inflamatório do TGF- β , a formação do granuloma constitui um importante mecanismo de defesa, onde o organismo tenta confinar a micobactéria. Normalmente observa-se a formação de fibrose ao redor da área central de necrose nos granulomas. Embora os mecanismos envolvidos na formação dessa estrutura não sejam totalmente conhecidos, acredita-se que a formação da matriz do granuloma tem por base uma área fibrótica. Várias citocinas estão envolvidas na fibrose pulmonar, inclusive o TGF- β . O aumento da produção local de TGF- β está

associado ao desenvolvimento de vários tipos de fibrose pulmonar (KHALIL et al. 1989; TOOSSI et al., 1995); essas observações mostrou que, de forma indireta, o TGF- β também está atuando na defesa do organismo contra a infecção por *M.Tuberculosis*.

Com relação à participação de citocinas produzidas pelos linfócitos T, sabe-se que os linfócitos exibem uma dicotomia com relação ao padrão de citocinas, similar ao descrito para os murinos (ROMAGNANI et al., 1996). O padrão de citocinas produzido pelos linfócitos T correlaciona-se com a manifestação clínica de certas infecções. Infecções com helmintos expressam preferencialmente o padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, ou seja, maior produção de IL-4 e IL-5, sendo que a IL-4 tem a capacidade de estimular a produção de IgE enquanto IL-5 promove o crescimento e diferenciação dos eosinófilos. Por outro lado, parasitas intracelulares parecem estimular a produção de citocinas com o padrão Th1. Muitos se tem escrito sobre a capacidade do IFN- γ atuar sobre macrófagos estimulando a atividade antimicobacteriana, provavelmente através do aumento de produção do peróxido de hidrogênio e dos metabolitos do óxido nítrico (FLESCHE & KAUFMANN, 1991; CHAN et al.; 1992). Camundongos que tiveram o gene para IFN- γ inativado, não são capazes de controlar a infecção por *M.bovis* e são normalmente mortos por uma dose sub-letal da micobactéria (DALTON et al.; 1993; KAMIJO et al., 1993). Pacientes portadores de *Lepra lepromatosa* tratados com IFN- γ tinham a capacidade de reduzir o número de bacilos (NATHAN et al., 1986). Por outro lado, a capacidade de o IFN- γ aumentar a atividade microbicida de macrófagos “in vitro” em humanos, continua questionável. Alguns autores trabalhando com o IFN- γ recombinante humano, não foram capazes de mostrar a capacidade de inibir a replicação da bactéria, quando os macrófagos foram estimulados com diferentes concentrações de IFN- γ e inclusive observaram que, quando as concentrações da citocina eram mais elevadas, havia um aumento da

multiplicação intracelular das micobactérias. Levando-se em consideração que a produção de IFN- γ está aumentada no local da infecção, os autores propõe que a participação do IFN- γ nas reações de hipersensibilidade também devem ser considerada. (DOUVAS et al., 1985; SHIRATSUCHI et al., 1990).

Del Prete e colaboradores, trabalhando com clones de células T CD4+, estimulados por MT, "in vitro" mostraram que as células propagadas pertenciam ao padrão Th1, ou seja, produziam altas concentrações de IFN γ e baixa quantidade de IL-4 e IL-5 (DEL PRETE et al., 1991; HAANEN et al., 1991). Outros autores concordam, mostrando também que na reação de hipersensibilidade local ao PPD, encontrou-se maior expressão de mRNA para citocinas do tipo Th1 que as Th2 (TSICOPOULOS et al., 1992). Por outro lado, outros laboratórios não observaram a polarização na produção de citocinas com clones estimulados com MT (BOOM et al., 1991; BARNES et al., 1993). Nossos dados mostram que não houve diferença significativa, em termos de produção de IFN- γ entre os três grupos de indivíduos estudados , quando as células foram estimuladas por PHA e PPD. Por outro lado, observamos acentuada depressão da produção de IFN γ , quando se utilizou o extrato de MT. Tanto o mitógeno policlonal como o PPD são potentes estimuladores das células T. Como mostramos nas tabelas de proliferação, houve depressão da resposta blastogênica dos linfócitos dos pacientes quando os mesmos foram comparados ao grupo de indivíduos normais, no entanto, uma importante resposta proliferativa ainda foi observada, que justificaria a produção de IFN- γ nos três grupos estudados. Chamamos a atenção , no entanto, que não estamos trabalhando com linfócitos CD4 purificados e que a maioria dos trabalhos mencionados utilizaram clones celulares. Embora a participação das células NK não seja muito relevante em doenças crônicas como a tuberculose e a participação das células CD8, como produtora de IFN γ , também não esteja muito estudada nesta doença, não podemos menosprezar a participação dessas populações celulares (WASSENAAR et al., 1996).

A supressão da produção $\text{IFN}\gamma$ pelos linfócitos estimulados com MT pode ser explicada, pela complexidade do antígeno. Como já foi mencionado, antígeno muito complexo pode conter determinantes que estimulam preferencialmente a produção de citocinas com função supressora da produção de $\text{IFN}\gamma$ no grupo de pacientes. Foi possível detectar “in vitro” a produção elevada de $\text{TGF}\beta$, de pacientes com tuberculose RT. O $\text{TGF}\beta$ sabidamente regula negativamente os efeitos do $\text{IFN}\gamma$. Alguns autores mostraram, nos diferentes modelos de infecção de parasitas intracelulares, que a produção aumentada de $\text{TGF}\beta$ por macrófagos, devido à própria infecção, inibia tanto a produção como a função estimuladora de $\text{IFN}\gamma$ (SILVA et al., 1991, BERMUDEZ et al., 1993)

Nosso estudo, portanto, é extremamente relevante no sentido de entender os mecanismos envolvidos na resposta imune deficiente dos pacientes portadores de Tuberculose pulmonar. A escolha dos dois grupos de pacientes foi muito pertinente, pois de um lado estudamos indivíduos com infecção relativamente recente e a resposta imune ainda preservada, de outro, pacientes incapazes de controlar a infecção, agravada ainda pelo desenvolvimento da resistência às drogas, normalmente utilizadas para inibir a replicação das micobactérias. Mostramos que nos dois grupos a imunidade celular encontra-se diminuída, sendo essa supressão mais acentuada no grupo de indivíduos refratários ao tratamento. Demonstramos que a imunidade celular deficiente está associada à estimulação de clones específicos para os antígenos micobacterianos, que por sua vez estimulam a produção e liberação de fatores supressores da resposta imune.

Acreditamos que a relevância maior deste estudo está no fato de alertarmos para a importância da pesquisa básica no entendimento da tuberculose no Brasil. Nosso trabalho deixa a informação que pacientes virgens de tratamento já apresentam comprometimento da resposta imune. Devido à exiguidade do tempo,

não foi possível acompanhar a imunidade dos pacientes virgens de tratamento, de forma longitudinal.

A literatura mostra que pelo menos 30% dos indivíduos portadores de tuberculose desenvolve resistência às drogas, seria, portanto extremamente interessante acompanhar a imunidade deste grupo de doentes no sentido de eventualmente interferir terapêuticamente e poder auxiliar no tratamento. Nosso estudo, portanto, mostra a importância do desenvolvimento de trabalhos científicos em colaboração entre a clínica e as ciências básicas no sentido de beneficiar o ser humano.

VI-CONCLUSÃO

Os dados apresentados permitem concluir que:

Pacientes com tuberculose pulmonar “virgens” e refratários ao tratamento apresentam a imunidade celular comprometida, sendo esta deficiência mais acentuada nos pacientes refratários ao tratamento.

Pacientes RT apresentam resposta proliferativa de linfócitos aumentada quando estimulados com PPD e normal em resposta ao MT.

Parte da supressão observada na resposta proliferativa de linfócitos dos pacientes RT se deve à produção de PGE₂.

A produção de TGF- β se encontra aumentada no grupo de pacientes portadores de Tuberculose pulmonar RT, enquanto está normal nos indivíduos “ virgens” de tratamento.

A produção de IFN- γ tende ser maior nos pacientes RT, quando as células foram estimulados por PHA e PPD.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APT, S. A, KRAMNIK & MOROZ, A. M. 1991. Regulation of T-cell proliferative responses by cells from solid lung tissue of M. tuberculosis-infected mice. **Immunology. 73:** 173-179.
- ASSOIAN W.;ROSS, FLEURDELYS, B.E.; STEVENSON,H.C.; MILLER,P.J.; MADTES, D.K.; RAINES,E.W.; ROSS,R. & SPORN, M.B. 1987. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. **Proc.atl.Acad.Sci.USA 84:** 6020-6024.
- BARNES, P.F.; ABRAMS, J.S.; LU, S.; SIELING,P.A; REA, H.T. & MODLIN, R.L. 1993(a). Patterns of cytokine production by mycobacteria-reactive human T cell clones. **Infect Immu. 61:**197-203.
- BARNES,P.F.;LU, S.; ABRAMS, J.S.;WANG,E.; YAMAMURA, M.; MODLIN, R.L. 1993(b). Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. **Infect Immu. 61:** 3482-3489.
- BARRAL-NETO, M. & BARRAL, A. 1994. Tranforming growth factor in tegumentary leishmaniasis. **Braz.J. Med Biol. Res. 27:** 1-9
- BERMUDEZ, L.E. 1993. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to INF-gama. **J Immunol.150:**1838-1845.
- BHATNAGAR, R.; MALAVIYA, A.N.; NARAYANAN, S.; RAJPALAN,P.; KUMAR, R. & BHARADWAJ,O.P. 1977 Spectrum of immune response abnormalities in clinical forms of tuberculosis. **Am Res. Respir. Dis. 115:** 207-213
- BLOOM, BR. & MURRAY, C.J.L. 1992 Tuberculosis: Commentary on a re-emergent killer. **Science. 257:**1055-1064.

- BOOM, W.H.; HUSSON, R.N.; YOUNG, R.A.; DAVID, J.R. & PIESSENS, W.F. 1987. In vivo and in vitro characterization of murine T cell clones reactive to *M.tuberculosis*. **Infect Immunol.** **55**: 2223-2229
- BOOM, W.H.; LIEBSTER, L.; ABBAS, A.I.C. & TITUS, R.G. 1990. Patterns of cytokines secretion in murine Leishmaniasis: correlation with diseases progression or resolution. **Infect. Immunol.** **58**: 3863-3870
- BOOM, W.H.; WALLIS, R.S.; CHERVENAK, K.A. 1991 Human *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD4⁺ T-cell clones: Heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity mononuclear phagocytes. **Infect Immun.** **59**: 2737-2743.
- BRISTOL, L.A.; RUSCETTI, F.W.; BRODY, D.T.; DURUM, S.K. 1990. IL-1 α induces expression of active transforming growth factor β in non proliferating T cell via post transcriptional mechanism. **J. Immunol.** **145**: 4108-4114
- CATALONA, W.J.; TAYLOR, P.T.; CHRETIEN, P.B. 1972. Quantitative dinitrochlorobenzene contact sensitization in normal population. **Clin. Exp. Immunol.** **12**: 325-333.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL 1991. Tuberculosis morbidity-United-States **MMWR** 1992. **41**: 240-244.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1989. Tuberculosis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: Recommendations of the Advisor Committee for the elimination of tuberculosis (ACET). **MMWR** **38**: 236-250.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1982. Tuberculosis control: Report of joint IUAT/WHO study group. **Tubercle.** **63**: 157-169

- CHAN, C.H.S.; XING,Y.; MAGLIOZZO, R.S. & BLOOM, B.R. 1992 Killing of virulent *M. tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J. Exp. Med.** **175**: 1111-1122
- CHAN,C.H.S.; LAY,, K.N.; LEUNG, J.K.C. & LAY, C. K. W. 1991 (a)- T lymphocyte activation in patient with active tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.** **144**: 458-460.
- CHAN,H.S.;PERSSIA,B. & GUPTA, J.W.; 1991(b) Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: Characterization of responder cells and synergy with other inducers. **J. Exp Med** **173**:869-879
- COLLINS F.M. 1993. Kinetics of the delayd-type hypersensitivity response in tuberculous guinea pigs and mice tested with several mycobacterial antigens. **Am Res Respir Dis.** **127**: 599-604
- COMSTOCK, G.W. 1982 Epidemiology of tuberculosis. **Am. Rev. Resp Dis.** **125** (suppl.) 8-21.
- CZARNIECKI, CW.; CHIU,H.H. & WONG, G.H.W. 1988. Transforming growth factor β modulantes the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. **J. Immunol** **140**: 4217-4223.
- DALTON, D. K.; PITTS-MEEK, S. & KESHAV, S. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ gene. **Science.** **259**: 1739-1742.
- DANNENBERG, A.M. & ROOK, G.A.W. 1994 Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of damaging and macrophage activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. IN: Bloom B. R. ed. Tuberculosis: Pathogenesis protection and control. Washington DC: American Society for Microbiology.

- DANNENBERG, A.M. 1984 Pathogenesis of Tuberculosis: native and acquired resistance in animals and humans. In L Leive, D Schlessinger (eds) **Microbiology** Pp- 344-354.
- DANNIELPOUR, D.E., DANTEL, L., FLANDERS, K.G., ROBERTES, A.B. & SPORM, N.B. 1989. Immunodetection and quantitation of two forms of transforming growth factor beta (TGF β 1-TGF β 2) secreted by cells in culture. **J. Cell. Physiol.** **55**:138-79.
- DE CARLI, M., BERTHOLD, S., FICKENSHER, H., FLECKENSTEIN, J.M., D'ÉLIOS, M.M., GAO, Q., BIAGIOTTI, R., GUIDIZI, M.G., KALDEN, J. & DEL PRETE, G.F. 1993. Immobilization with herpesvirus saimiri modulates the cytokines secretion profile of established Th1 and Th2 human T2 cells clones. **J. Immunol.** **151**: 5022-5030.
- DEL PRETE, G.; DEL CARLI, M. & ALMERIGOGNA, F. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen specific proliferation and cytokine production. **J Immunol.** **150**:353-360.
- DEL PRETE, G.F.; DEL CARLI, M.; MASTROMAURO, C.; BIAGIOTTI, R.; MACCHIA, D.; FALAGIANI, P.; RICCI, M. & ROMAGNANI, S. 1991. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory antigen(S) of *toxocara canis* expand *in vitro* human cell with stable and opposite (type 1 helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. **J. Clin. Invest.** **88**: 346-350.
- DEL PRETE, G.F.; DEL CARLI, M.; RICCI, M. & ROMANGNANI, S. 1991. Helper activity immunoglobulin synthesis of T helper type 1 Th1 and Th 2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. **J. Exp. Med.** **174**: 809 -813

- DIAZ-BARDALES, B.M.; ZACCARIAS, C.; GARCIA, C.A.A.; SCAGLIUSI, M.S. & SANTOS, M.L.B. 1996. Modulação da severidade da IEI por antígenos derivados de micobactérias. XXI Reunião anual da Sociedade brasileira de Imunologia. Interaction meeting on Cytokine 1.03 pg 75.
- DING, A.; NATHAN, C; GRAYCAR, R.; DERNICK, R.; STUEHR, D.J. & SRIMAL. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming factor beta1, beta 2 and beta 3 inhibiting of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **J Immunol.** 145: 940-946.
- DOUVAS, G.S.; LOOKER, D.L.; VATTER, A. E. & CROWLE. 1985. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. **Infect. Immun.** 50:1-8.
- ESPENIK, T.; FIGARI, I.S. & SHALABY, M.R. 1987. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth β . **J. Exp. Med.** 166: 571-576.
- FLANDERS, K.C.; ROBERTS, A.B.; LING, N.; FLEURDELYS, B.E. & SPORN, M.B. 1988 Antibodies to peptides determinants in transforming growth factor β and their applications. **Biochemistry** 27 : 739-746.
- FLESC, I.E.A. & KAUFMANN, S.H.E. 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon activated bone marrow macrophages: Role of reactive nitrogen intermediates. **Infect Immun.** 59:3213-3218.
- FLESC, I.E.A. & KAUFMANN, S.H.E. 1993. Role of cytokines in tuberculosis. **Immunol.** 189: 316-339
- FLYNN, J.L.; GOLDSTEIN, M.M.; TRIEBOLD, K.J; KOLLER, B. & BLOOM, R. B. .1993. Major histocompatibility complex class I-restricted T cell are

required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proc Natl. Acad Sci USA** . **89**: 12013-12017.

FUJIWARA, H.; KELEINHENZ, M.E. & WALLIS R.S. 1986. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. **Am Rev Respir Dis**. **133**: 73-77

GOODWIN, J.S.; MESSER, R.P. & PEAKE, G.T. 1978. Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes "in vitro" changes with mitogen dose and preincubation. **J. Clin. Invest**. **62**: 753-760.

GROTENDORST, G.R.; SMALE, G. & PENCEV, D. 1989. Production of transforming growth factor by human peripheral blood monocytes and neutrophils. **J. Cell. Physiol**. **140**: 396-402

HAANEN, J.B.A.G.; WAAL MALEFIJIT, R.; RES, P.C.M.; KRAAKMAN. E.M.; OTTENHOFF, T.H.M.; VRIES, R.R.P. & SPITS, H. 1991 Selection of human T helper type 1 like T cell subset by mycobacteria. **J. Exp. Med**. **174**: 583-592

HANANO,R. & KAUFMANN, S.H.E. 1995 Nitric oxide production and mycobacterial growth inhibition by murine alveolar macrophages: the sequence of IFN γ stimulation and mycobacterium bovis BCG infection determines macrophage activation. **Immunol. Lett**. **45 (suppl-2)** 23-27.

HEINZELK F.P., SADICK M.D., HOLADAY B.J., COFFMAN R.L. & LOCKSLEY R.M. 1989. Reciprocal expression of interferon gama or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T cell subset. **J. Exp. Med**. **169**:59-72.

HO, JL. & RILEY, L.W. 1996 Defense against tuberculosis. In: CRYSTAL, R.G.;WEST,J.B; WEIBEL, E. & BARNES, P.J. eds. The lung: **Scientific Foundations**. 2 nd. ed.

- HOLLAND,S.M.; EISENSTEIN,E.M.; KHUNS,D.B.; TUNER.M.L.;
FHEISHER,T.A.; STROBER, W. & GALLINI. J.I. 1994 Treatment of
refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with INF- γ .
N.Engl. J. Med. **330**: 1348-1355.
- HOPEWELL, P. 1995 A clinical view tuberculosis . **Rad. clin. North Am.** **33**: 641-
653
- JANIS, E.M. & KAUFMANN,S.H.E. 1989. Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary
immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Science.** **244**: 713-716.
- JOHNSON, B.J. & MC MURRAY,D.N. 1994.Cytokine gene expression by cultures
of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected
monocytes. **Infect Immun.** **62**:1444-1450
- KALIL, N.; BERENZAZAY, O. & SPORN,M. 1989. Macrophage production of
transforming growth factor beta and fibroblast collagen sythesis in chronic
pulmonary inflammation. **J.Exp Med.** **170**: 727-737.
- KAMIJO, R. & LE J, SHAPIRO, D. 1993. Mice that lack the interferon - γ receptor
have proloundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin
and subsequent challenge with lipopolysaccharide. **J Exp Med.** **178**: 1435-
1440.
- KAUFMANN,S.H.E. 1988 CD 8+ T lymphocytes in intracellular microbial
infections. **Immunol Today.** **9**:168-174.
- KEHRL J.H., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., JAKOWLEW S., SPORN
M.B. & FAUCI A.S. 1986 (a). Transforming Growth Factor β Is Important
Immunomodulatory protein For Human B Lymphocytes. **J. Immunol.**
137:3855-3860.

- KEHRL J.H., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., JAKOWLEW S., ALVAREZ-MON, M.; DERYNCK, R.; SPORN, M.B. & FAUCI, A.S. 1986 (b). Production Transforming Growth Factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J. Exp. Med.** **163**: 1037-1050.
- KHOMENKO, A.G. 1987. The variability of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with cavitary pulmonary tuberculosis in the course of chemotherapy. **Tubercle.** **68**: 243-253.
- KOCHI, A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. **Tubercle.** **72**:1-6
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANOLA, W.N.; SCHRECKENBERG, P.C.; WINN, W.C.J.-Mycobactéria. In: KONEMAN, E.W & ALLEN, S.D. eds. 1992. Diagnost microbiology. Lippincott, Philadelphia. 703-755.
- LAW, K.F. 1996 Tuberculosis in HIV-positivo patients: cellular response and imune activation in the pulmonari. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** **153**. 1377-1384
- LAWRENCE, D.A.; PICHER, R. & JULLIEN, P. 1985. Conversion of a high molecular weight latent TGF- β from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weigt active TGF- β under acid conditions. **Biochem. Biophys Res Commun.** **133** : 1026-1034.
- LEE H.M. & RICH S. 1991. Co-stimulation of T cell proliferation by transforming growth factor β 1. **J. Immunol.** **147**:1127-1133.
- LENZINI, L.; ROTTOLI, L. & ROTOOLI, L. 1977. The spectrum of human tuberculosis. **Clin Exp Immunol.** **27**: 230-235.
- LEVIN, J. 1987. Estatística aplicada a Ciências Humanas. 2ª edição. Editora Harbra Ltda. SP. 193-265.

- LEWIS C.E., McCARTHY S.P., LORENZEN J. & MCGEE J.O.D. 1989. Heterogeneity among human mononuclear phagocytes in their secretion of lysozyme, interleukin 1 and type β transforming growth factor: a quantitative analysis at the single-cell level. **Eur. J. Immunol.** 19:2037-2041.
- LUCAS C., BALB L.N., FEUDLY B.M., WORMN M.M., FIGARI I.S., PATZER E.J. & PALLADINO M.A. 1990. The autocrine production of transforming growth factor β , during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. **J. Immunol.** 145: 1415-1422.
- LYONS R.M. KESKY-OJA J. & MOSES H.L. 1988. Proteolytic of latent transforming growth factor β from fibroblast condition medium. **J. Cell. Biol.** 106:1659-1665.
- MAGGI, E.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R. 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. **J Immunol.** 148:2142-2147.
- MALAVIYA, A.N; SELGAL, R.; KUMAR, R. & DINGLEY, H.B. 1975. Factors of delayed hipersensibility in pulmonary tuberculosis. **Am Rev. Respir. Dis** 112: 49-52
- MILLER, A.A. AL SABBAGH , SANTOS, L.M.B.; PRABHU DAS, M.& WEINER, H.L. 1993. Epitopes of myelin basic that trigger TGF- β release after oral tolerization from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. **J. Immunol.** 151: 7307-7315.
- MORENO, C. MEHLERT, A. & LAMB, J. 1988. The inhibitory effects of mycobacterial liporabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. **Clin Exp Immunol.** 74: 206-210.

- MOSMANN, T.R. & MOORE, K.W. 1991. The role of IL-10 in crossregulations of Th1 and Th2 response. **Parasitol. Today.** A49-A53.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI H., BOND M.W., GIEDLIN M.A. & COFFMAN R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.** 136: 2348-2357
- NATHAN, C.F.; KAPLAN, G. & LEVIS, W.R. 1986. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon- γ in patients with lepromatous leprosy. **N. Engl J Med.** 315: 6-15
- ORME, I.M. 1987. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol.** 138:293-298
- ORME, I.M. 1988 Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* in infection. **J Immunol.** 140:3589-3593.
- ORME, I.M.; ANDERSEN, P.; BOOM, W.H. 1993. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis.** 167:1481-1497.
- ORME, I.M.; ROBERTS, A.D.; GRIFFIN, J.P. 1993. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol.** 11:518-525.
- ORME, I.M.; STOKES, R.W. & COLLINS, F.M. 1986 Genetic control of natural resistance to nontuberculous mycobacterial infections in mice. **Infect Immun.** 54:56-62
- ORTALDO, J.R., MASON A.T., O'SHEA J.J., SMITH M.J., FALK L.A., KENNEDY I.C.S., LONGO D.L. & RUSCETTI R.W. 1991. Mechanistic studies of transforming growth factor β inhibition of IL-2-dependent activation

of CD3-large granular lymphocyte function of IL-2R β (p75) signal transduction. **J. Immunol.** 146:3791-3798.

PALIARD X.R., DE WALL M., YSSEL H., BLANCHARD D., CHRETIEN I., ABRAMS J., DE VRIES J.E. & SPITS H. 1990. Simultaneous production of IL-2, IL-4 and IFN-gama by human CD4+ and CD8+ T cell. **J. Immunol.** 144:849-853.

PERSON, M.J.; JERED, J.A.; FRIEDEN, T.R.; CRAWFORD, J.T.; DAVIS, B.J.; DOOLEY S.W.; JARVIS, W.R.1992. Nosocomial transmission of multidrug-resistant M. Tuberculosis. **Annals of Internal Medicine.** 117: n.3, 191-196.

RANGERS G.E., FIGARI I.S., ESPEVIK T. & PALLADINO M.B. 1897. Inhibition of cytotoxic T cell development by recombinant tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.** 166: 991-996.

RAVIGLIONE, M. C.; SNIDER, D.E. & KOCHI, A. 1995 Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA.** 273: 220-226.

REICHMAN,L.B.1991. The U-shaped curve of cancer.**Am Rev Respir.**144:741-742.

ROBINSON, D.S.; YING, S; TAYLOR, I.K.; WNAGO, A.; MITCHEL, D.M.; HAMID, Q. & SHAW, J.R. 1994- Evidence for Th1-like bronchoalveolar T cell subset and predominance of IFN- γ gene activation in pulmonary. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** 149: 989-993.

ROMANGNANI, S. 1992 (b). Induction of Th1 an Th2 responses: a key role for the "natural" immune response. **Immunol. Today.** 13: 379-382.

ROMANGNANI, S. 1992(a). Human Th1 and Th2 subsets:doubt no more. **Immunol. Today.** 12: 256-257

- ROMANGNANI, S.; O' GARRA, A. & MURPHY. 1996 Th1 e Th2 cells in Health and Disease. **Chem Immunol.** **63.** 1-13.
- ROOK, A.H.; KERHRL, J.H.; WALERFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; BURLINGTON, D.B.; LANE, H.C. & FAUCI, A.S. 1986. Effects of transforming growth factor β on the functions of natural killer cell: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. **J. Immunol.**, **136:** 3916-3920.
- ROOK,G.A,W.; TAVERNE, J.;LEVETON, C. & STEELE, J. 1987 The role of gamma interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunol.****62:** 229-234.
- RUEGEMER, J.J.; HO, S.N.; AUGUSTINE, J.A.; SCHLAGER, J.W.; BELL, M.P.; McKEAN, D.J. & ABRAHAN, R.T. 1990. Regulatory effects of transforming growth factor β on IL-2 and dependent T cell-cycle progression. **J. Immunol.** **144:** 1767-1776..
- SANTOS, L.M.B., LIDER O., A. AUDETTE, J., KHOURY, S.J. & H.L. WEINER.1990. Characerization of immnomodulatory properties and accessory cell function of small intestinal epithelial **Cells Immunol** **127:** 26-34.
- SANTOS, L.M.B; AL-SABBAGH A.,LONDONO,A. & WEINER H.L. 1994. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF β secreting T cell in Peyer patche of SJL mice. **Cell. Immunol.** **151:** 7307-7315.
- SCOTT, P.; NATOVITZ, P. & COFFMAN, R.L. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to diferent T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J Exp Med.** **168:**1675-1684.

- SHALABY, M.R. & AMMANN, A.J. 1988. Suppression of immune cell function in vitro by recombinant human transforming growth factor β . **Cell Immunol.** 112:342-349.
- SHIRATSUSUCHI, H. & TSUYUGUCHI. 1984. Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with purified protein derivative of tuberculin. **Clin. Exp. Immunol.** 57: 271-274.
- SHIRATSUSUCHI, H., JOHNSON, J.L. & TOBA, H. 1990. Strain-and donor-related differences in the interaction of *Mycobacterium avium* with monocytes and its modulation by interfero-gamma. **J. Infect Dis,** 162: 932-938.
- SIEPL, C.; BODMER, S.; FREI, K.; MacDONALD, H.R.; DE MARTIN, R.; HOFER, E. & FONTANA, A. 1988. The glioblastoma-derived T cell suppressor factor/transforming growth factor- β inhibits T cell growth without affecting the interaction of interleukin 2 with its receptor. **Eur. J. Immunol.** 18:593-598.
- SIFFORD, M. & BATES, J.H. 1991 Host determinants of susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis*. **Semin. Resp. Infect.** 6: 44-50
- SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R. & REED, S.G. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF β). **J. Exp. Med.** 174: 539-545.
- SPITLER, L.E. 1976 Delayed hypersensitivity skin testing. In manual of clinical immunology (Eds. N.R. Rose and H. Friedman) **Am Soc. for Microb.**, p. 56.
- SURCEL, H.M.; TROYE-BLOMBERG, M., PAULIE, S., ANDERSSON, G. MORENO, C., PASVOL, G. & IVANYI, J. 1994. Th1/ Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokines responses of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. **Immunology.** 81: 171-176

- SWAIN, S.L.; BRADLEY, L.M.; CRFT,M.; TONKONOGY,S.;ATKINS, G.; WEINBERG,A.D.; DUCAN,D.D.; HEDRICK, S.M.; DUTTON,R.W. & HUSTON, G.1991. Helper T subsets: phenotype, function, and the role of lymphokines in regulating their development. **Immunol. Rev.** **123**: 115-144.
- THOMAS, M.D.1982 Robert Koch. Tuberculosis and subsequent history of Medicine. KOCH R. Die a Etiologie Der Tuberculose. Berl Klin Woch. Centenary Koch. **Am. Rev. Resp. Dis.** **125** (suppl.).1-8
- TISUNAWAKI, S.M.; SPORN,A.; DING,A. & NATHA,C. 1988. Deactivation of macrophages by TGF- β . **Nature.** **334**: 260-267.
- TOOSSI, Z.; YOUNG, T.; AVRRIL, L.;HAMILTON, B.;SHIRATSUCHI, H. & ELLENER, J.J. 1995b- Induction of TGF β 1 by PPD of Mycobacterium tuberculosis. **Infect. Immun.** **63**: 224-228.
- TSICOPOULOS, A.; HAMID, Q. & VARNEY, V. 1992. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cell (IFN-gama+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypresessitivity reactions in human skin. **J. Immunol.** **148**: 2058-2061.
- WASSENAR, A. REINHARDUS, C., ABRAHAM-INPIJN & KIEVITIS, F. 1996. Type-1 and type-2 CD8+ T-cell subsets isolated from chronic adult periodontitis tissue differ in surface phenotype and biological functions. **Immunology** **87**:113-118.
- WIEGESHAUS, E.H.; McMURRAY D.N. & GROVER, A.A. 1970. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis.III. Relevance of microbial enumeration to aquired resistance in guinea pigs. **Am Rev Respir Dis** **102**: 422-429

- YAMAMURA,M.; UYEMURA,K. & DEANS, R.J.1991. Defining protective responses to pathogens: Cytokines proliferate in leprosy lesions. **Science**.254:227-279.
- YOUMANS,G.P.1975 Relation between delayed hypersensitivity and immunity in tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.** 111: 109-118
- YOUMANS,G.P.1979. Tuberculosis. **Saunders.** W. B. Philadelphia.
- ZHANG, M.; GONG,J.; IYER, D.V.; J.; JONES, B.; MODLIN, R.L. & BARNES, P.F. 1994b -T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and HIV infection. **J. Clin. Invest.** 94: 2435-2442.
- ZHANG, M.; LIN,Y.; IYER, D. V.;WANG, E.; LU, S. & BARNES, P.F. 1995 -T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** 63 : 3 231-3234.

Quadro Ia. Caracterização do grupo de pacientes portadores de tuberculose pulmonar virgens de tratamento e refratários ao tratamento, quanto à identificação, idade e sexo.

Virgens de Tratamento				Refratários ao Tratamento			
Nº	Identificação	Idade	Sexo	Nº	Identificação	Idade	Sexo
1	MSS	26	M	1	EGF	38	M
2	CS	43	F	2	RMFS	35	F
3	RF	23	F	3	AFS	46	M
4	FBSJ	21	M	4	DBLD	39	F
5	CDS	33	M	5	RC	61	M
6	MBP	23	F	6	DFR	33	F
7	DBP	24	M	7	DGD	32	F
8	MPS	40	F	8	IRS	38	M
9	RCS	35	F	9	EDS	21	M
10	MBC	25	M	10	RES	32	M
11	CS	36	M	11	MALF	38	M
12	LCS	28	M	12	RRR	25	F
13	LCD	28	F	13	NMD	55	M
14	LCRM	20	M	14	AS	63	M
15	JDC	38	F	15	EMS	35	M
16	CMO	36	F	16	AMM	43	M
17	MSS	18	F	17	MAFL	36	F
18	AS	31	M	18	AF	65	M
19	GAP	27	F	19	LCG	37	M
20	ACC	22	F	20	AJ	32	M
21	JRR	28	M	21	GD	70	M
22	JSC	52	M	22	SMO	25	F
23	CMJS	21	F	23	SCM	21	F
24	LRS	26	M	24	JCC	37	M
25	JCG	23	F	25	JP	26	M
26	WBN	38	M	26	DON	26	M
27	JABM	39	M	27	LCC	38	M
28	BAC	36	M	28	JMB	43	F
				29	SSC	22	F
				30	GJS	21	M
				31	ES	20	F
				32	JRL	24	F
				33	VSL	42	F
				34	JCLS	45	M
				35	SOS	22	F

Quadro Ib. Caracterização do grupo de indivíduos normais quanto à identificação, idade e sexo.

Nº	Identificação	Idade	Sexo
1	PMVZ	25	F
2	MFBS	20	F
3	SRV	25	F
4	IRC	21	F
5	EB	21	F
6	ARF	25	F
7	AMA	34	F
8	RG	39	M
9	AZC	36	F
10	DMR	23	F
11	ANB	24	M
12	SB	21	M
13	SMO	25	F
14	BSR	24	F

Tabela Ia. Testes cutâneos de leitura tardia realizados em pacientes portadores de tuberculose pulmonar “virgens “ de tratamento. Resultados expressos em mm. Sensibilização ao DNCB: Resultado negativo (neg) ou positivo (+).

Paciente	Candidina	Tricofitina	PPD	DNCB
MSS	4	4	12	neg
CS	4	4	13	+
RF	neg	1	12	neg
FBSJ	10	neg	12	neg
CDS	3	neg	12	NC
MBP	neg	neg	17	+
DBP	3	3	17	+
MPS	neg	neg	18	+
RCS	14	2	15	+
MBC	5	8	15	+
CS	NC	NC	5	NC
LCJ	NC	NC	14	NC

NC= não compareceu NR= não realizado

Tabela Ib. Testes cutâneos de leitura tardia realizados em pacientes portadores de tuberculose pulmonar refratária ao tratamento. Resultados expressos em mm. Sensibilização ao DNCB: Resultado negativo (neg) ou positivo (+).

Pacientes	Candidina	Tricofitina	PPD	DNCB
1 EGF	6	neg	16	neg
2 RMFS	neg	neg	NR	neg
3 AFS	neg	4	14	neg
4 DBLD	2	4	14	+
5 RC	neg	neg	16	neg
6 DFR	neg	neg	14	+
7 DGD	neg	neg	17	neg
8 IRS	3	neg	18	neg
9 EDS	neg	neg	9	NC
10 RES	3	neg	9	neg
11MALF	6	neg	18	neg
12 RRR	NR	NR	12	NR
13 NMD	18	5	12	+
14 AS	10	2	10	+
15 EMS	10	8	20	neg
16 AMM	12	2	22	+
17 MAFL	neg	neg	20	NR
18 AF	3	6	22	+
19 LCG	NR	NR	NR	NR
20 AJ	5	neg	5	neg

NC= não compareceu NR= não realizado

Quadro II. Caracterização dos pacientes portadores de tuberculose “virgens” e refratários ao tratamento quanto à baciloscopia, cultura, teste anti-HIV

“Virgens”				Refratários			
Nº	BK	HIV	cultura	Nº	BK	HIV	cultura
1	+	-	-	1	+	neg	M.tuberculosis
2	+	neg	-	2	+	neg	M.tuberculosis
3	+	neg	-	3	+	neg	Mtuberculosis
4	+	neg	-	4	+	neg	M.tuberculosis
5	+	neg	-	5	+	neg	M.tuberculosis
6	+	neg	-	6	+	-	M.tuberculosis
7	+	neg	-	7	+	neg	M.tuberculosis
8	+	neg	-	8	+	neg	M.tuberculosis
9	+	neg	-	9	+	-	M.tuberculosis
10	+	-	-	10	+	neg	M.tuberculosis
11	+	-	-	11	+	neg	M.tuberculosis
12	+	-	-	12	+	neg	Mtuberculosis
13	+	-	-	13	+	-	-
14	neg	neg	-	14	+	-	Mtuberculosis
15	+	neg	-	15	+	neg	-
16	+	neg	-	16	neg	-	Mycobac sp
17	+	neg	-	17	neg	neg	Mtuberculosis
18	+	neg	-	18	+	neg	Mtuberculosis
19	+	neg	-	19	+	-	Mtuberculosis
20	+	neg	-	20	+	neg	Mtuberculosis
21	+	neg	-	21	+	neg	Mtuberculosis
22	+	neg	-	22	+	neg	Mtuberculosis
23	+	neg	-	23	+	neg	neg
24	+	neg	-	24	+	-	-
25	+	neg	-	25	+	neg	Mtuberculosis
26	+	-	-	26	+	-	Mtuberculosis
27	+	-	-	27	+	neg	-
28	+	neg	-	28	+	neg	Mtuberculosis
				29	+	neg	Mtuberculosis
				30	+	neg	Mtuberculosis
				31	+	neg	-
				32	+	neg	Mtuberculosis
				33	+	-	Mtuberculosis
				34	+	neg	M.tuberculosis
				35	+	-	M.tuberculosis

Quadro III. Caracterização dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar refratários quanto`a tempo aproximado de doença.

Tempo de atividade da doença			
Identificação	tempo	Identificação	tempo
1	3 anos	19	4 anos
2	6 anos	20	8 anos
3	6 anos	21	40 anos
4	9 anos	22	2 anos
5	7 anos	23	3 anos
6	3 anos	24	12 anos
7	5 anos	25	4 anos
8	4 anos	26	2 anos
9	4 anos	27	2 anos
10	10 anos	28	4 anos
11	8 anos	29	3 anos
12	10 anos	30	3 anos
13	12 anos	31	4 anos
14	4 anos	32	3 anos
15	-	33	5 anos
16	3 anos	34	6 anos
17	6 anos	35	2 anos
18	25 anos		

Quadro IV. Resultado do antibiograma de paciente refratários

Nº	PZA	INH	EMB	RMP	ST	ETH	PAS	KANA	CICLO	OFX	R	T	cl
1		R		R	R				R				
2		R	R	R	R				R	R			
3		R	R	R	R				R				
4		R		R	R					R			
5		R		R	R	R							
6		R		R	R								
7		R	R		R			R	R				
8		R								R			
9		R		R									
10		R		R	R					R	R		
11	R	R	R				R		R	R			R
12	-												
13	sensível todas as drogas												
14	NR												
15	-												
16	NR												
17	NR												
18	NR												
19	R	R	R	R	R					R	R		R
20		R	R	R	R	R							
21		R	R	R	R						R		
22	R	R	R	R	R								
23	-												
24	-												
25	R	R		R		R							
26		R	R	R	R	R							
27	-												
28		R	R	R	R								
29	R	R	R	R							R		
30			R										
31		R	R	R									
32		R			R				R				
33	R	R	R	R	R								
34		R	R	R	R	R							
35		R	R	R									

PZA-Pirazinamida, INH-Isoniazida, EMB-Etambutol, RMP-Rifampicina, ST-Estreptomicina, ETH-Etionamida, PAS-Ácido para-amino salicílico, KANA-Kanamicina, Ciclo-Ciclosserina, Ofx-Ofloxacin, R-Rifambutina, CL-Clofazimicil, T-Tiosemicarbazona.

Tabela III. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (“virgens” e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados por PHA (50 µg/ml). Resultados expressos em contagens por minuto (cpm)

	s/est.	VT	s/est.	RT	s/est.	N
1	728	34963	178	4161	2037	74529
2	452	31921	225	25763	894	36726
3	272	38977	871	18420	807	42614
4	477	65826	645	8786	946	74461
5	578	80244	645	20398	1779	60278
6	225	27300	469	14410	1995	104677
7	275	60610	517	14996	3579	142007
8	319	65226	730	37531	727	74450
9	439	42580	346	34718	502	46588
10	1079	45009	546	44956	462	98033
11	823	10311	485	30259	786	82046
12	88	27052	3975	39122	1355	64525
13			957	54121	1034	173722
14			914	141913	5244	83582
15			229	11279		
16			580	13385		
17			696	24764		
18			540	21841		
19			162	26689		
20			366	50040		
21			259	12217		
22			285	21168		
23			134	10478		
24			238	12354		
Média	479.5	44168.2	624.6	28907.0	1581.9	82731.2
Dp ±	270.7	19306.7	738.2	27013.5	1293.6	36431.9

Tabela IV. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (virgens e refratários ao tratamento) e de indivíduos normais estimulados com PPD (50 µg/ml). Resultados expressos em contagens por minuto (cpm).

	s/est.	VT	s/est.	RT	s/est.	N
1	1782	2763	178	7939	1350	2510
2	452	825	287	9864	1760	3114
3	272	1416	1362	25250	240	1025
4	335	754	666	9135	867	2382
5	578	1623	1078	12476	168	539
6	812	4656	1238	19406	3153	15617
7	960	6879	1093	16261	831	7633
8	420	5155	346	36625	792	4714
9	381	9233	546	20134	1183	15927
10	986	2797	112	22980	3115	31296
11	421	7615	209	16623	1293	22093
12	329	23500	341	2403	1639	3738
13			1864	4468	361	5581
14			914	6469	179	1537
15			462	2717		
16			580	2147		
17			497	10563		
18			472	9771		
19			162	3591		
20			366	27718		
21			259	8576		
22			285	5800		
23			134	3528		
24			238	7270		
Média	644	5601.3	570.3	12154.7	1209.3	8407.5
Dp ±	416.6	6027	447	8953	932.1	8970

Tabela V. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar (“virgens” e refratários ao tratamento) e indivíduos normais estimulados por MT H37Ra 50 µg/ml. Resultados expressos em contagens por minutos (cpm).

	s/est.	VT	s/est.	RT	s/est.	N
1	1782	3008	178	6499	1356	4579
2	452	735	287	10659	1760	4805
3	272	1414	1362	16579	240	1193
4	335	965	666	2729	867	3198
5	578	822	1078	5985	367	2133
6	812	9359	1238	9431	3153	22138
7	960	7065	1093	11277	831	13554
8	319	2184	346	45162	792	5513
9	381	4139	546	10147	1183	21930
10	986	2880	118	12821	3115	40356
11	421	4312	209	6410	1293	34121
12	329	9349	632	3667	1639	6722
13			1864	6722	597	5692
14			914	6017	179	2387
15			462	3323		
16			580	2475		
17			497	4849		
18			472	10345		
19			164	735		
20			765	22344		
21			259	7789		
22			285	4185		
23			134	2308		
24			238	4872		
Média	635.5	3852.6	599.4	9055.4	1240.8	12022.9
Dp ±	422.1	3010.7	443.3	8943.5	903.6	12241

Tabela VI. Resposta proliferativa de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose refratária estimulados por PHA,PPD e MT H37Ra. Testados com indometacina (IM). Resultados expressos em (cpm).

	PHA	PHA-IM	PPD	PPD-IM	MT	MT-IM	s/est.
	10331	15812	7512	6505	4312	4056	421
	27052	27280	21991	21050	6530	4901	393
	12244	22551	18752	20836	10659	14000	287
	18420	16855	22554	23933	15709	19344	1362
	6711	8786	9135	2790	2729	5386	666
	14636	20398	12476	14685	5985	11030	1078
	14410	14068	19406	13287	9431	12841	1238
	14996	13489	16261	15799	11277	14409	1093
	24764	45086	10563	14383	2407	4849	497
	21841	18112	9771	11819	9095	10097	472
	37531	39110	36625	45550	45162	48396	346
	21283	24942	20134	20079	7496	9559	546
	39673	38571	9224	16737	12821	13180	209
	30259	30254	16623	19612	6410	9135	485
	26689	38854	3591	11804	735	2058	164
	27904	36457	22588	19950	22344	36698	765
	12217	16804	8576	9897	7786	6499	259
	21168	24692	5800	4185	4185	4245	285
	9425	10478	3528	3528	2308	2282	134
	6493	12354	7270	7161	4872	3159	238
Média	19902.3	23747.6	14119	15179	9612.6	11806.2	546.9
Dp±	9375.7	10699.7	8075.7	9325.7	9564.8	11376.9	362.0

Tabela VII Secreção de TGF β por linfócitos do sangue periférico de pacientes portador de tuberculose pulmonar “virgens” de tratamento estimulados com PHA, PPD e MT. Resultados expressos em nanograma /ml.

	s/est.	PPD	MT	PHA
	0.35	0.23	0.37	0.29
	1.98	1.42	1.25	1.03
	0.57	0.64	0.73	0.56
	1	0.69	0.79	0.66
	1.03	1.02	1.27	0.58
	1.22	1.76	0.82	0.63
	1	1.34	0.68	2.5
	1.12	0.9	1.35	0.08
	2.18	2.88	2.6	2.16
	2.16	1.74	1.53	2.22
	1.4	1.09	0.79	1.16
	1.07	1.04	1.64	1.44
	0.16	0.18	0.19	0.4
	0.23	0.28	0.23	0.2
	0.55	1.18	1.85	0.72
	0.33	0.23	0.3	0.28
	0.3	0.33	0.3	3.59
	0.26	0.21	0.46	0.24
	0.3	0.34	0.31	0.2
Média	0.90	0.92	0.91	0.99
Dp$\pm$	0.64	0.68	0.64	0.94

Tabela VIII - Secreção de TGF β por linfócitos do sangue periférico de pacientes portador de tuberculose pulmonar refratários ao tratamento estimulados com PHA, PPD e MT. Resultados expressos em nanograma /ml.

	s/est.	PPD	MT	PHA
	0.79	0.65	1.15	1.11
	0.21	0.28	0.26	0.18
	1.52	1.61	1.95	1.43
	1.05	1.04	1.29	1.12
	1.4	1.5	0.71	0.78
	2.92	2.99	3.79	2.11
	3.63	3.56	3.62	3.84
	1.49	1.36	1.48	1.23
	1.18	1.26	0.81	1.16
	0.88	0.42	0.43	0.41
	0.25	0.2	0.21	0.28
	1.74	2.98	3.62	3.47
	0.69	0.51	1.4	0.7
	0.47	0.55	0.43	0.35
	0.42	1.8	0.57	0.43
	1.01	0.43	0.7	0.84
	0.71	0.81	0.57	0.28
	0.44	0.32	0.28	0.24
	0.7	0.78	0.7	0.53
	0.32	0.46	0.34	0.18
	0.76	0.58	0.77	0.84
	0.98	3.7	1.4	2.14
	1.33	1.16	1.5	1.23
	4.16	3.23	5.8	1.87
	1.24	3.06	1.16	1.58
	1.31	0.88	1.59	6.3
	1.77	2.12	1.29	
		1.15	1.82	2.06
		1.8	1.92	5.31
Média	1.23	1.42	1.43	1.5
Dp$\pm$	0.94	1.06	1.26	1.50

Tabela IX - Secreção de TGF β por linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais, estimulados com PHA, PPD e MT. Resultados expressos em nanograma /ml.

	s/est.	PPD	MT	PHA
	1.19	0.53	0.53	0.51
	0.29	0.42	0.5	0.64
	0.24	0.35	0.37	0.39
	0.59	0.64	0.32	0.52
	0.21	0.25	0.33	0.27
	0.82	2.77	0.81	1.05
	0.75	1.28	0.61	0.61
	1.54	1.04	0.77	1.42
	0.99	0.7	0.7	1.28
	0.76	1.28	0.82	0.51
	0.5	0.5	1.55	0.5
	0.33	0.36	0.7	0.28
	0.93	0.72	0.65	2.22
Média	0.70	0.83	0.66	0.78
Dp$\pm$	0.38	0.64	0.30	0.54

Tabela X. Produção de IFN γ por linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar refratários ao tratamento estimulados com PPD, MT H37Ra e PHA. Resultados expressos em picograma /ml

	PPD	MT	PHA
	70	340	0
	350	590	120
	70	150	170
	500	320	60
	180	180	10
	300	200	1880
	862	680	932
	760	1150	2038
	350	750	260
	520	890	1610
	280	360	410
	220	0	550
	1120	450	0
	200	0	0
	30	0	120
	3650	0	100
	450	240	390
	190	600	950
	170	50	710
	320	320	1020
Média	529,6	363,5	566,5
Dp$\pm$	765,6	317,2	630,0

Tabela XI. Produção de IFN γ por linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar “virgens” ao tratamento estimulados com PPD, MT H37Ra e PHA. Resultados expressos em picograma /ml

	PPD	MT	PHA
	330	200	560
	150	50	1590
	400	420	710
	210	80	460
	300	140	350
	160	10	520
	260	140	340
	470	160	3900
	190	0	1820
	220	120	510
	240	340	490
	0	9	600
	0	138	590
	220	0	260
	0	340	390
	230	550	530
	220	320	640
	2460	1040	1890
	140	0	140
	130	100	720
Média	316,5	207,85	850,5
Dp $\pm$	505,7	243,6	847,0

Tabela XII. Produção de IFN γ por linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais estimulados com PPD, MT H37Ra e PHA. Resultados expressos em picograma/ml.

	PPD	MT	PHA
	470	730	550
	250	510	220
	360	940	260
	290	730	380
	330	850	350
	410	850	740
	920	1140	470
	410	460	410
	730	540	80
	0	430	570
Média	417	718	403
Dp $\pm$	241,37	220,67	181,44