

# Secreção do Fator de Necrose Tumoral Alfa na Reação de Hipersensibilidade Retardada Induzida pela Tuberculina

*Um Modelo Experimental para o Estudo da Secreção de Citocinas na Doença Inflamatória \**

José Luiz Tavares (1); Rory Shaw (2);  
Aron Wangoo (3); Mandhu Goyal (3); Ben Marshall (3)

## RESUMO

Linfócitos T e macrófagos têm papel importante nas reações imunes celulares da tuberculose pulmonar. Após estimulação com antígenos bacterianos, as células T secretam linfocinas tais como interferon gama que ativam macrófagos que, por sua vez, produzem e liberam fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa). Admite-se que o TNF alfa tem papel central nas infecções por *Mycobacterium tuberculosis* gerando resposta granulomatosa. Entretanto, também tem sido observado o papel do TNF alfa nas manifestações tóxicas da tuberculose. Para investigar a ocorrência do TNF alfa nas reações de hipersensibilidade retardada induzidas pela tuberculina nós desenvolvemos um modelo "ex-vivo" de cultura tecidual. Pacientes com dados clínicos e radiológicos de tuberculose pulmonar prévia foram submetidos ao teste cutâneo tuberculínico - *Heaf test*. Aqueles que exibiram resultados compatíveis com o diagnóstico de "reator forte" foram submetidos à biópsia cutânea no local do teste. Neste fragmentos a secreção de TNF alfa foi investigada por técnicas de imunohistoquímica. Biópsias de pele normal foram também obtidas dos mesmos pacientes e a viabilidade da cultura até quatro dias foi determinada usando hibridização *in situ* com 3H uridina (uridina tritiada). Neste modelo experimental observamos que biópsias de pele podem ser mantidas viáveis em cultura por até quatro dias e que a secreção de TNF alfa estava presente nas amostras obtidas de sítios nos quais a reação tuberculínica havia sido determinada. Considerando que eram pacientes com história patológica pregressa de tuberculose pulmonar, a administração intradérmica de tuberculina promoveu a reação clássica de hipersensibilidade retardada na qual a secreção de TNF alfa parece ter importante papel.

## ABSTRACT

Pulmonary tuberculosis is a disease in which T lymphocytes and macrophages play a important role in the mechanism of cell mediated immune reactions. After being stimulated by mycobacterial antigens, T cells secrete lymphokines such as interferon gamma that activate macrophages which, in turn, will produce and release tumor necrosis factor alfa (TNF alfa). It is accepted that TNF alfa has a central role in *Mycobacterium tuberculosis* infections by generating a granulomatous response but it has also been observed the role of TNF alfa in toxic manifestations of tuberculous diseases. To investigate the occurrence of TNF alfa in tuberculin -

(\*) Projeto desenvolvido no departamento Respiratory Medicine / St. Mary's Hospital Medical School, Imperial College of Science, Technology and Medicine - University of London.

(1) Professor Adjunto de Pneumologia - UERJ, Pós-Doutorado em Respiratory Medicine - University of London.

(2) Chefe do departamento acima mencionado.

(3) Pesquisadores associados do departamento acima mencionado.

Artigo recebido para publicação no dia 04/01/1998 e aceito no dia 13/01/1998, após revisão.

induced delayed type hypersensitivity reactions we developed an ex-vivo model of tissue culture. Patients presenting a previous diagnosis (clinical and radiological) of pulmonary tuberculosis were submitted to Heaf test. Skin biopsies were obtained in those patients who presented accentuated local reaction and TNF alfa secretion was investigated by immunochemistry technique. Normal skin biopsies were also obtained in the same patients and viability of tissue cultured up to four days was determined by using in situ hybridization with 3H uridine. In the ex-vivo model we developed it was observed that normal skin biopsies could be kept viable in culture up to four days and that TNF alfa secretion was present in every positive Heaf test biopsy sample examined. Considering the patients had been submitted to tuberculosis treatment in the past, the intradermal administration of tuberculin promoted a classical delayed type hypersensitivity reaction in which TNF alfa secretion seems to play an important role.

**Palavras-chave:** fator de necrose tumoral alfa.

**Key-word:** Tumor necrosis factor alfa

*Pulmão-RJ 1998; 7(1): 46-53*

## INTRODUÇÃO

Tem sido observado o ressurgimento da tuberculose na última década. *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) tem alguns componentes como complexos protéicos e polissacarídeos da parede celular que agem como estímulo para respostas inflamatórias (1-4). A tuberculose é um exemplo clássico da infecção intracelular na qual a imunidade celular é bastante relevante e envolve tanto os linfócitos T como os macrófagos. Interferon gama (IFN gama) e fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) são duas citocinas, secretadas por células inflamatórias, que tem grande importância nos mecanismos imunopatogênicos das doenças inflamatórias. Em uma seqüência de eventos (4-6), linfócitos T ativados liberam IFN gama que determina acúmulo local e ativação de macrófagos. Estes macrófagos ativados apresentam produção aumentada de TNF alfa. IFN gama liberado pelos linfócitos T pode aumentar a atividade antimicrobiana de macrófagos aumentando a produção de peróxido de hidrogênio, o que facilita a eliminação intracelular da bactéria. Macrófagos acumulados se diferenciam em células epitelióides que também são ricas em TNF alfa, etapa importante na formação do granuloma e na morte bacteriana. A exposição de monócitos ou macrófagos ao TNF alfa leva a um aumento na expressão do mRNA do TNF alfa e na liberação do TNF alfa por estas células em um processo de auto-amplificação que aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos e a morte bacteriana (1, 7). Muitos macrófagos são mortos durante a fagocitose, o que promove a liberação de enzimas lisossomais, de peróxido de hidrogênio,

de proteases e de mediadores inflamatórios que podem causar dano tecidual, necrose caseosa e liquefação seguida de cavitação (3, 8).

Em um modelo experimental de tuberculose (4), IFN gama inibiu o crescimento intracelular do M.tb em macrófagos murinos. Camundongos com ruptura do gen do IFN gama mostraram aumento da susceptibilidade à infecção pelo M.tb com evidencia de extensa necrose tecidual e grande número de bacilos (4). Entretanto, estes autores observaram que em estudos humanos, IFN gama não foi capaz de inibir a replicação micobacteriana em monócitos ou macrófagos a menos que combinados com outras citocinas ou produtos de monócitos.

Em outro estudo experimental (9), granulomas pulmonares foram induzidos em camundongos pela embolização de partículas acopladas ao derivado protéico purificado do M.tb. Usando anticorpos contra IFN gama e TNF alfa verificou-se que o tamanho dos granulomas reduzia em 20% e 40%, respectivamente. No mesmo estudo, macrófagos foram isolados das lesões, cultivados e o sobrenadante examinado quanto à presença de TNF alfa. A associação de anticorpos anti-IFN gama reduziu a produção de TNF alfa pelas células em cultura em 70%. Estes autores concluem que IFN gama e TNF alfa são mediadores centrais na resposta ao antígeno micobacteriano.

O desenvolvimento de granulomas após infecção sistêmica com patógenos intracelulares tais como M.tb é um modelo clássico de imunidade celular. Em um estudo experimental (6), camundongos foram injetados com BCG e foi notado que a formação de granulomas hepáticos coincidia com

o acúmulo local de macrófagos e com a síntese de TNF alfa. A administração de anticorpos anti-TNF alfa reduziu o número e o tamanho dos granulomas e também evitou ou suprimiu o acúmulo do mRNA do TNF alfa assim como da proteína TNF alfa na lesão. No homem, a hibridização *in situ* foi usada para demonstrar a presença do mRNA do TNF alfa em gânglios linfáticos obtidos de pacientes com tuberculose pulmonar (10). Foi observado que o mRNA do TNF alfa era detectado em células epitelióides, células gigantes e linfócitos no material biopsiado.

Na tuberculose pulmonar, células T produzem interleucina 2 e IFN gama (11). Em pacientes com tuberculose pulmonar tem sido evidenciado que o mRNA do IFN gama esta presente nos linfócitos T CD4 (12) e o mRNA do IFN gama tem sido também identificado nas amostras de pele biopsiadas de pacientes com *Heaf test* positivo (13). O *Heaf test* é uma reação de hipersensibilidade retardada na qual a inoculação de tuberculina ao indivíduo previamente imunizado resulta no influxo de células mononucleares com uma visível área eritematosa e endurecida de intensidade máxima no quinto ou sétimo dia após inoculação (14).

Neste trabalho, nosso objetivo foi usar um modelo "ex-vivo" humano do *Heaf test* para avaliar a participação do TNF alfa nestas reações inflamatórias.

## PACIENTES E MÉTODOS

### (I) Pacientes

Pacientes com história prévia de tuberculose pulmonar foram submetidos ao *Heaf test* no qual a tuberculina era inoculada na pele do antebraço esquerdo e o resultado da reação observada registrado no quinto dia após a inoculação. Pacientes com grau 3 ou 4 do *Heaf test* (grau 3 = induração com 5 a 10 mm de diâmetro e grau 4 = induração com diâmetro maior do que 10 mm) foram recrutados da Clínica de Tórax do St. Mary's Medical School, Imperial College of Science and Technology, University of London.

### (II) Métodos

#### (a) Técnica de biópsia e congelamento para imunohistoquímica:

Uma amostra inicial 3 mm de espessura) de pele (área de induração) foi obtida de cada paciente no quinto dia após injeção intradérmica de tuberculina.

O fragmento biopsiado era imediatamente colocado em 5mL de meio de cultura (RPMI-1640, 25mM Herpes buffer/Gibco BRL com 100 U/mL penicilina-estreptomicina/Gibco BRL e 2 mM glutamina/Gibco BRL) e transportado no gelo para o laboratório aonde era dividido em duas partes produzindo, portanto, duas amostras finais para cada paciente.

Uma destas amostras era removida do meio, mergulhada em solução para congelamento e então armazenada em nitrogênio líquido. Amostras assim preparadas foram consideradas amostras "tempo Zero".

A amostra remanescente era então colocada em uma placa de cultura de plástico (Lab-Tek, Nunc, Inc. Vaperille, USA) com 1 mL de meio de cultura com 1mL de soro fetal bovino (ICN Lab., High Wycombe, UK). A placa era então selada em um saco plástico e colocada em uma câmara para cultura de tecidos alimentada por mistura de 95% de oxigênio com 5% CO<sub>2</sub> (Bellco Glass Inc, Vineland, USA) que era, por sua vez, colocada em incubadora e mantida a 36,8°C durante 6, 24 ou 48 horas. Tais amostras eram consideradas / identificadas como amostras "Tempo 6, 24 ou 48 horas", na dependência do momento de interrupção da cultura. Após o apropriado intervalo de tempo (6, 24 ou 48 horas), as amostras eram então removidas do meio, mergulhadas em solução para congelamento e estocadas em nitrogênio líquido.

Após congelamento, amostras de 3 a 4 µm de espessura eram cortadas, a partir dos blocos congelados, e montadas em lâminas de vidro. Em cada lâmina eram colocadas duas amostras da mesma biópsia. Uma amostra destinava-se à imunohistoquímica para identificação do TNF alfa e a outra servia para controle da técnica na qual não se utilizava qualquer anticorpo.

#### (b) Técnica de imunohistoquímica para identificação do TNF alfa:

As lâminas eram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol para amortecer a atividade da peroxidase endógena e, a seguir, lavadas em salina tamponada com fosfato (PBS) e tripsinizadas (0,5% tripsina e 0,5% quimotripsina, Sigma) durante 15 minutos em estufa a 37°C para remoção de determinantes antigênicos. As lâminas eram então lavadas em água destilada durante 10 minutos e em BS durante 5 minutos.

As lâminas eram então colocadas em uma câmara úmida e 50µL de soro de coelho (Dako, Ltd.)

em PBS (diluição 1:10) era aplicada em cima de cada fragmento biopsiado e assim mantido por 30 minutos para evitar ligações não específicas. As lâminas eram então lavadas em PBS durante 5 minutos. A seguir, adicionava-se 50µL de anticorpo anti-TNF alfa (UBI, New York, USA), diluídos em solução de soro de coelho (soro 1:10 PBS) em apenas um dos fragmentos de cada lâmina. O outro fragmento, na mesma lâmina, era considerado como controle da técnica e a solução de diluente, sem anticorpo, era adicionado a este fragmento. As lâminas eram então mantidas por toda a noite, até a manhã seguinte, em câmara úmida a -4°C.

No dia seguinte, as lâminas era então lavadas em PBS durante 15 minutos, mergulhadas em 3% peróxido de hidrogênio em metanol durante 10 minutos e lavadas novamente em PBS durante 15 minutos. A seguir, 50µL de anticorpos secundários (soro de camundongos marcados com biotina), diluídos (1:250) em solução de soro de coelhos (soro 1:20 PBS), eram adicionados em cada fragmento e assim mantidos por uma hora na temperatura ambiente. A seguir, as lâminas eram então lavadas em PBS durante 15 minutos e incubadas na temperatura ambiente com solução de avidina (1:125) / biotina (1:125) diluídas em soro de coelho (soro 1:20 PBS). Após 30 minutos as lâminas eram então lavadas em PBS por 10 minutos e então uma solução de 0,5% de peróxido de hidrogênio em diaminobenzidina (Sigma, UK) era adicionada em cada fragmento na lâmina, durante 3 minutos, para desenvolvimento da reação, produzindo uma coloração acastanhada nos casos "positivos". Após lavar em água corrente, as lâminas eram coradas com hematoxilina durante 1 minuto e, após secar, eram montadas com uma lamínula.

As lâminas eram então avaliadas sob uma escala semiquantitativa com resultados variando entre coloração fracamente positiva (+) e fortemente positiva (++) . As lâminas eram então codificadas e examinadas sem o conhecimento da informação relativa aos fragmentos corados com anticorpos ou com diluentes.

### **(c) Técnica para avaliação da viabilidade tecidual:**

A viabilidade da cultura tecidual foi também investigada considerando que estaríamos trabalhando com fragmentos de biópsia para investigação da secreção de citocinas. Fragmentos biopsiados de pele normal foram colocados em meio de cultura, conforme já descrito, em placas de cultura

tecidual com 4 poços cada (Nunc, Inc. Naperville, USA). As placas eram seladas em sacos plásticos e mantidas em câmara de cultura alimentadas com mistura gasosa de 95% oxigênio e 5% CO<sub>2</sub> (Bellco Glass Inc, Vineland, USA). Ao serem removidos, os fragmentos eram colocados em 0,5 mL de meio de cultura com 5µL de 3H uridina (Amersham, Bucks) e ali mantidos por 40 minutos na temperatura ambiente. As amostras eram então lavadas três vezes em meio de cultura e fixadas em álcool acético durante 25 minutos. A seguir, os fragmentos eram fixados em 10% formalina, embebidos em parafina e cortados para subsequente montagem em lâminas.

Para serem processadas, as lâminas eram reidratadas e mergulhadas em uma emulsão nuclear fotográfica Ilford misturada com glicerol e aquecida a 42°C em câmara escura. Após secarem ao ar ambiente as lâminas eram guardadas em uma caixa hermeticamente fechada que era acondicionada em um saco plástico e mantida em refrigerador a 4°C durante 10 dias.

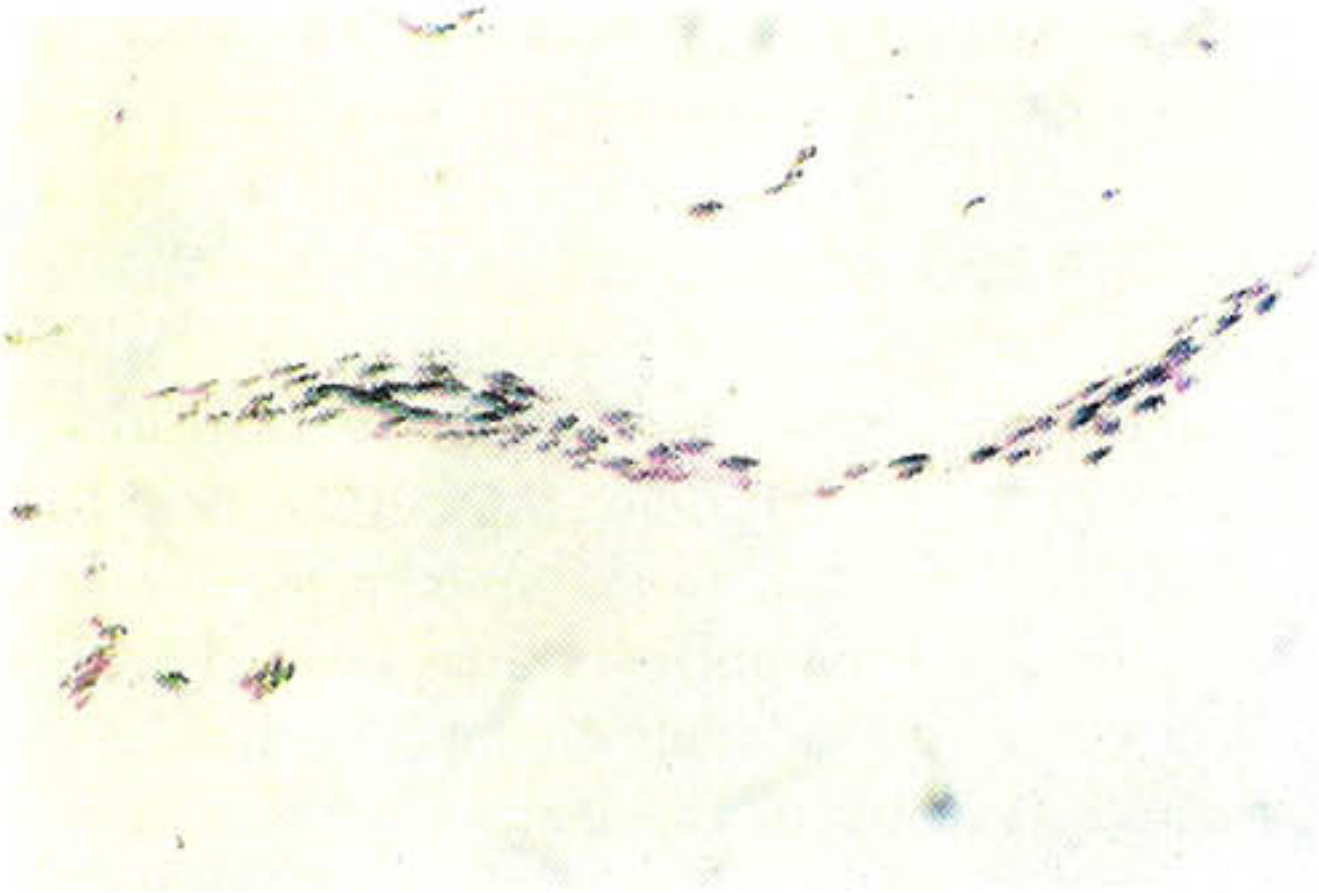
A seguir, as lâminas eram submetidas ao processo de revelação no qual eram colocadas nas seguintes soluções: revelador fenisol (Ilford) diluído em água destilada durante 2 minutos; ácido acético glacial a 1% e glicerol a 1% diluídos em água destilada durante 1 minuto para interromper a reação; tiosulfato de sódio a 30% (BDH Merck Ltd, Poole, Dorset) diluído em água destilada durante um minuto para fixação e, a seguir, lavagem em água destilada durante 4 minutos. Por último, as lâminas eram novamente lavadas durante 10 minutos em água destilada e coradas com hematoxilina. Após secarem eram então montadas com lamínula.

Após este processo, as lâminas era examinadas para verificar a presença de mRNA e, conseqüentemente, checar a viabilidade tecidual. Cem fibroblastos eram contados em três áreas distintas da derme. Células contendo 5 ou mais pigmentos negros eram consideradas como sendo positivas. A percentagem média de células positivas era calculada para cada lâmina.

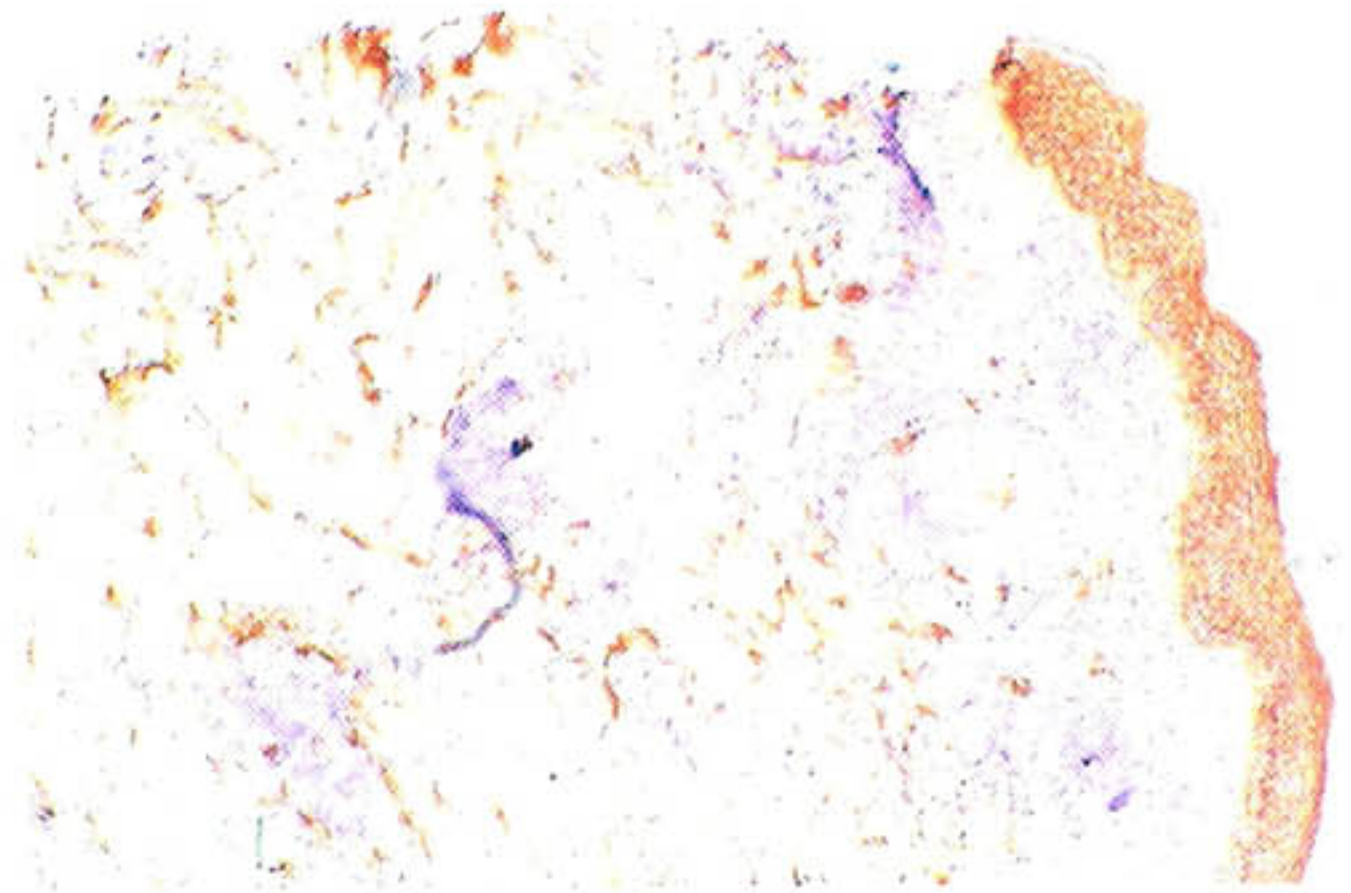
## **(III) Resultados**

### **(a) Viabilidade tecidual**

Mais de 80% dos fibroblastos nos fragmentos cultivados eram viáveis até o quarto dia de cultura (Fig. 1), sugerindo que fragmentos de pele podem ser mantidos em cultura por este período sem comprometimento de sua viabilidade funcional.



**FIGURA 1** - Fibroblasto evidenciando presença de mRNA marcado (pontos negros) por hibridização in situ com H3 uridina confirmando viabilidade tecidual.



**FIGURA 2** - Identificação da presença "fortemente positiva" de secreção de TNF alfa pela técnica de imuno-histoquímica.

**(b) Secreção de TNF alfa pelas biópsias teciduais**

Seis pacientes foram estudados. Cada paciente foi submetido à biópsia de pele fornecendo um fragmento dividido em duas metades. Uma delas era imediatamente congelada e considerada como amostra "tempo ZERO". A outra metade era cultivada em meio por 6, 24 ou 48 horas e considerada como amostra "tempo 6, 24 ou 48 horas", respectivamente. Após este período de cultivo, tais amostras eram igualmente congeladas. Após processamento por imuno-histoquímica para TNF alfa resultados foram quantificados. Em todas as amostras a coloração foi positiva sendo fortemente positiva em quatro do total (Fig. 2 e Tabela 1). Não foram identificadas amostras negativas. Não identificamos coloração nas amostras consideradas como "controle".

**(IV) Discussão**

A eficácia da imunidade celular contra o M.tb é demonstrada na ampla faixa de variação de síndromes clínicas da doença. Em uma extremidade estão as apresentações como a tuberculose miliar na qual a imunidade celular ineficaz é manifestada pelos testes cutâneos negativos com a tuberculina e pela disseminação da doença com grande número de bacilos em múltiplos órgãos (1). Na outra extremidade desta faixa de variação estão as lesões granulomatosas circunscritas que detêm a integridade do sistema imune celular no qual células inflamatórias e seus mediadores tais como TNF alfa são bastante relevantes no que se refere à morte do M.tb e à resolução da reação inflamatória.

Tabela 1. IMUNO-HISTOQUÍMICA - IDENTIFICAÇÃO DO TNF alfa

PACIENTE	tempo "ZÉRO"	tempo "6 horas"	tempo "24 horas"	tempo "48 horas"
1	+	+		
2	++	++		
3	+		+	
4	+		+	
5	+			+
6	++			++

(+) = coloração positiva

(++) = coloração fortemente positiva

É amplamente aceito que o TNF alfa tem um papel central nas infecções pelo *M. tb*, gerando uma resposta granulomatosa que expressa imunidade celular efetiva. Entretanto, já foi verificado o papel relevante do TNF alfa nas manifestações tóxicas da doença tuberculosa. Para investigar o papel do TNF alfa na tuberculose humana, *in vivo*, a produção local de citocinas foi investigada em pacientes com pleurite tuberculosa (1). Foi evidenciada a presença de TNF alfa no líquido pleural em níveis mais elevados quando comparado com concentrações sanguíneas nos mesmos pacientes. Da mesma forma, mRNA do TNF alfa foi detectado no tecido pleural destes doentes por hibridização *in situ*. Foi, então, sugerido que as manifestações clínicas da tuberculose pleural poderiam estar relacionadas aos efeitos das concentrações de TNF alfa elevadas localmente, em resposta aos antígenos micobacterianos.

Admite-se que, em altas concentrações, TNF alfa leve à toxicidade incluindo perda de peso, fraqueza muscular, sudorese noturna e necrose tecidual (15). Monócitos sanguíneos de pacientes com tuberculose liberam maior quantidade de TNF alfa e expressam níveis mais elevados de mRNA do TNF alfa em resposta a agonistas incluindo PPD, em comparação com controles normais, sugerindo que tais células sejam ativadas *in vivo* pela infecção (3, 15).

Estudos do comportamento do TNF alfa em muitas doenças infecciosas no homem demonstram que o TNF alfa pode ter efeitos benéficos ou nocivos em diferentes pacientes infectados pelo mesmo organismo patogênico. Os efeitos benéficos do TNF alfa são geralmente obtidos quando pequenas quantidades imunologicamente ativas são produzidas durante os mecanismos de defesa tecidual. Em contraste, a liberação sistêmica de maiores quantidades de TNF alfa podem determinar a ocorrência de choque circulatório e injúria tecidual. Tem sido observadas diferenças interindividuais na produção de TNF alfa por monócitos sanguíneos isolados de voluntários normais e isso pode estar relacionado ao sistema HLA de histocompatibilidade (16).

Como já foi mencionado, respostas imunopatogênicas ao *M.tb* dependem da ativação de macrófagos mediada por células T antígeno-específicas, principais efetores da morte de micobactérias patogênicas intracelulares. Modelos de infecção com patógenos intracelulares tais como *Toxoplasma*, *Legionella* e *Leishmania* sugerem que a ativação de macrófagos na morte intra-

celular ocorre pela produção de IFN gama por linfócitos CD4 antígeno-específicos (7). Nestas infecções, a produção de IFN gama é deficiente e isso é provavelmente relacionado ao processo de doença (4). O papel protetor do IFN gama como fator de ativação de macrófagos na doença micobacteriana pode ser claramente demonstrado em modelos animais de tuberculose nos quais este mediador inflamatório inibe o crescimento intracelular do *M.tb* em macrófagos (4).

O principal objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental no qual fosse possível se avaliar a secreção de citocinas sob estímulo específico. Inicialmente, a viabilidade da cultura tecidual foi investigada. A marcação do mRNA de fibroblastos com 3H uridina mostrou que fragmentos de biópsia são viáveis em cultura até quatro dias, com 80% dos fibroblastos evidenciando marcação positiva para o mRNA. Após esta verificação, investigamos a secreção do TNF alfa nos fragmentos de pele que haviam sido estimulados pela tuberculina. Observamos coloração positiva em cada amostra cultivada até 48 horas. TNF alfa foi reconhecido como um importante mediador derivado de macrófagos em uma variedade de reações patológicas. Alguns componentes do sistema célula imune como os linfócitos T e células *natural killer* também tem sido identificadas como produtores de TNF alfa mas monócitos e macrófagos são a principal fonte desta citocina (20, 21). Admite-se que os macrófagos necessitam de estágio prévio de ativação antes de se iniciar a produção de TNF alfa. Nesta etapa preliminar BCG e IFN gama (20) representam este estímulo inicial. Após estimulação antigênica, as células T produzem e secretam IFN gama e outras linfocinas tais como interleucina 2 que irá ativar monócitos e macrófagos que, por sua vez, irão produzir e liberar TNF alfa (4, 5, 6).

Neste modelo experimental que desenvolvemos, a secreção de TNF alfa foi identificada em todas as amostras examinadas. Considerando que os pacientes relatavam história prévia de tuberculose, a administração intradérmica de tuberculina promoveu a resposta clássica de hipersensibilidade retardada na qual a secreção de TNF alfa foi verificada.

Células T *helper* são divididas em duas subpopulações de acordo com o perfil de citocinas secretadas: células Th 1 que secretam interleucina 2 (IL2) e IFN gama e atuam nas reações de hipersensibilidade retardada e células Th 2 que

secretam IL4, IL5 e IL10 (4, 5, 7, 17, 18). Estas duas subpopulações de células T *helper* aparentemente tem papéis diferentes na resistência adquirida à infecção. Células Th 1 promovem a imunidade celular aos parasitos intracelulares secretando IFN gama que é um potente ativador de macrófagos e as células Th 2 determinam a formação de anticorpos e a imunidade humoral.

Espera-se que o padrão Th 1 seja identificado em doenças nas quais se observa reações de hipersensibilidade retardada e formação de granulomas como a tuberculose (17). IFN gama secretado pelas células Th 1 protege camundongos de infecções letais contra o parasita intracelular *Leishmania donovani* e a injeção de anticorpos anti-IFN gama reduz a resistência dos camundongos à infecção pela *Leishmania major* (17).

Por outro lado, a secreção de IL4 pelas células Th 2 tem efeito adverso na proteção contra a infecção por *Leishmania* desde que anticorpos anti IL4 podem curar camundongos infectados com este parasita intracelular (17). IL4 parece inibir a atividade de macrófagos induzida pelo IFN gama e favorecer a proliferação de células Th 2. A verificação de ativação policlonal extensa e a ativação específica de células B em infecções micobacterianas experimentais e humanas parece sugerir que fatores de estimulação de células B tais como IL4 podem estar associado com a redução da resistência à infecção pelas micobactérias (7). Assim, em infecções com organismos intracelulares, células Th1 se correlacionam com fenótipos resistentes enquanto células Th2 se correlacionam com suscetibilidade à infecção.

Micobactérias são organismos intracelulares obrigatórios e mecanismos similares podem estar envolvidos no que se refere a infecções por micobactérias e *Leishmania* nas quais as células Th 1 teriam papel protetor e as células Th 2 determinariam respostas prejudiciais. Tais observações são bastante relevantes quanto à tuberculose no homem nos pacientes que tem forte evidência de resposta mista Th1 e Th 2. Pacientes podem ter lesões necróticas sugestivas de processo mediado por TNF alfa tendo sido induzido por células Th1. Por outro lado, células Th 2 podem ser responsáveis pelo comprometimento de funções bactericidas de macrófagos ativados que são essenciais para o desenvolvimento da imunidade ao M.tb.

Admite-se (19) que citocinas Th 1 aumentam a atividade Th 1 e inibem a atividade Th 2. Assim, a

resposta Th 1 deveria ser estável. Há algumas explicações para a mudança do padrão de resposta Th 1 para o padrão Th 2. Os macrófagos IFN gama ativados de pacientes com tuberculose expressam atividade alfa hidroxilase e convertem a vitamina D3 - 25 (OH) inativa no derivado ativo calcitriol 1,25 (OH).

Este composto promove a maturação de macrófagos, aumenta a liberação subsequente de TNF alfa por estas células, inibe a produção de IFN gama e de IL2 e aumenta a produção de IL4 e IL5 levando a um desvio do padrão Th 1 para Th 2 (5, 19). Além disso, IL4, juntamente com outras citocinas, pode também agir como importante fator de comprometimento da responsividade das células Th 1 nas infecções, especialmente se secretada em estágio inicial da resposta imune. Assim, o padrão Th2 pode estar envolvido na perda da resposta protetora do hospedeiro e relacionada à patogênese da tuberculose (18).

Outra possibilidade está relacionada ao eixo pituitário-adrenal que estaria comprometido nas infecções pelo M.tb (19). Na tuberculose há a possibilidade da redução na função adrenal refletida pelos baixos níveis de metabólitos esteróides nas amostras de urina de 24 horas. Tais pacientes têm níveis reduzidos de dehidroepiandrosterona (DHEA). Em pessoas normais, DHEA aumenta a atividade Th 1 e inibe os efeitos do padrão Th 2. Em pacientes com tuberculose, portanto, seria verificado um desvio do padrão Th1 para Th 2 o que acarretaria uma queda na contagem de células CD4 habitualmente verificada nestes pacientes (19).

No trabalho que desenvolvemos, observamos a presença de padrão de secreção TNF alfa que pode sugerir perfil de ativação celular Th 1. Esta verificação reforça o conceito que células Th1 são preferencialmente envolvidas nos mecanismos patogênicos relacionados à formação de granulomas na tuberculose (12). Trabalhos futuros devem ser desenvolvidos para estudar o efeito de determinadas drogas na secreção de TNF alfa nas reações de hipersensibilidade retardada. Já foi demonstrado que a talidomida reduz a produção de TNF alfa por macrófagos alveolares (22) e por monócitos sanguíneos (15) e que isto poderia estar associado com a redução da toxicidade clínica do TNF alfa geralmente vista em pacientes com tuberculose. Desta forma, seria válido avaliar o efeito de drogas como a talidomida na secreção de TNF alfa em reações de hipersensibilidade retardada induzidas pela

tuberculina usando-se modelos experimentais como o que apresentamos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Barnes PF, Fong SJ, Brenan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990; 145: 149-154.
- 2-Cadranel J, Philippe C, Philippe B, Milleron B, Fouqueray B, Mayaud C, Baud L. Increased expression and occupancy of receptors for tumor necrosis factor on blood monocytes from tuberculous patients. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 51-56.
- 3-Schauf V, Rom W, Smith K, Sampaio E, Meyn P, Tramontana J, Cohn Z, Kaplan G. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. *J Infect Dis* 1993; 168: 1056-1059.
- 4-Wallis R & Ellner J. Cytokines and tuberculosis. *J Leuk Biol* 1994; 55: 676-681.
- 5-Rook G, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987; 62:229-234.
- 6-Kindler V, Sappino A, Grau G, Piguet P, Vassali P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; 56: 731-740.
- 7-Appelberg R, Orme I, Pinto de Souza M, Silva M. In vitro effects of interleukin 4 on interferon gamma induced macrophage activation. *Immunology* 1992; 76: 553-559.
- 8-Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; 59: 3021-3025.
- 9-Chensue S, Warmington K, Ruth J, Lincoln P, Kunkel S. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. *J Immunol* 1995; 154: 5969-5976.
- 10-Myatt N, Coghill G, Jones D, Cree I. Detection of tumor necrosis factor alpha in sarcoidosis and tuberculosis granulomas using in situ hybridization. *J Clin Pathol* 1994; 47: 423-426.
- 11-Barnes P, Abrams J, Lu S, Sieling P, Rea, T, Modlin R. Pattern of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive human T cell clones. *Infect Immun* 1993; 61: 197-203.
- 12-Robinson D, Sun Y, Taylor I, Wangoo A, Mitchell D, Kay A. Evidence for a Th1 like bronchoalveolar T cell subset and predominance of interferon gamma gene activation in pulmonary tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 149: 989-993.
- 13-Tsicopoulos A, Hamid Q, Varney V, Ying S, Moqbel K, Durham S. Preferential messenger RNA expression of Th1 type cells in classical delayed type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* 1992; 148:2058-2061.
- 14-Wangoo A, Cook T, Taylor G, Shaw R. Enhanced expression of type 1 procollagen and transforming growth factor beta in tuberculin induced delayed type hypersensitivity. *J Clin Pathol* 1995; 48: 339-345.
- 15-Kaplan G. Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. *Immunobiol* 1994; 191: 564-568.
- 16-Tracey K. TNF and Mae West or: death from too much of a good thing. *Lancet* 1995; 345: 75-76.
- 17-Haanen J, Malefijt R, Res P, Kraakman E, Ottenhoff T, de Vries R, Spits H. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by *Mycobacteria*. *J Exp Med* 1991; 174: 583-592.
- 18-Surcel H, Troye-Blomberg M, Paulie S, Andersson G, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J. Th 1/Th 2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunol* 1994; 81: 171-176.
- 19-Rook G & Hernandez-Pando R. T cell helper types and endocrines in the regulation of tissue-damaging mechanisms in tuberculosis. *Immunobiol* 1994; 191: 478-492.
- 20-Strieter R, Remick D, Lynch J, Spengler R, Kunkel S. Interleukin 2 induced tumor necrosis factor alfa gene expression in human alveolar macrophages and blood monocytes. *Am Rev Resp Dis* 1989; 139: 335-342.
- 21-Debets J, Ruers T, van der Linden M, van der Linden C, Bunrman W. Inhibitory effect of corticosteroids on the secretion of tumor necrosis factor by monocytes is dependent on the stimulus inducing tumor necrosis factor synthesis. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 224-229.
- 22-Tavares JL, Wangoo A, Dilworth P, Marshall B, Kotecha S, Shaw R. Thalidomide reduces tumor necrosis factor-alpha production by human alveolar macrophages. *Resp Medicine* 1997; 91:31-39.