

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Eliana Peresi

**Citocinas e proteínas de fase aguda do soro
como marcadores de regressão da resposta
inflamatória pelo tratamento, na tuberculose
pulmonar.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a Dra. Jussara Marcondes Machado

Botucatu

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Peresi, Eliana.

Citocinas e proteínas de fase aguda do soro como marcadores de regressão da resposta inflamatória pelo tratamento, na tuberculose pulmonar / Eliana Peresi. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007.

Orientadora: Jussara Marcondes Machado

Assunto CAPES: 40602001

1. Pulmões - Tuberculose - Aspectos imunológicos

CDD 616.24

Palavras-chave: Citocinas; *Mycobacterium tuberculosis*; Resposta de fase aguda; Tuberculose

Mensagem



“O homem pretende ser imortal e para isso defende princípios efêmeros. Um dia, inexoravelmente, descobrirá que para ser imortal deverá defender Princípios Absolutos. Nesse dia, morrerá para a carne, efêmera, e viverá para o Espírito, Eterno. Será Imortal.”

Dr. Celso Charuri

A thin, hand-drawn pinkish-red border frames the entire page. In the bottom-left corner, there is a cluster of overlapping, rounded, pinkish-red shapes that resemble stylized flowers or petals.

Dedicatória

Aos meus pais,

Miyako e Luiz Peresi

Por me darem a vida e me ensinarem a ser uma pessoa digna.

Por acreditarem em mim, sempre me ajudando de todas as formas, apoiando os momentos difíceis e comemorando as alegrias e conquistas.

Pelo incentivo para a realização deste trabalho.

Muito obrigada por tudo que fizeram por mim até hoje.

Pelo amor, amizade e dedicação incondicionais.

Ao meu irmão

Guilherme Peresi

Apesar de distantes, sempre unidos, amigos e companheiros.

Obrigada pelo seu amor e amizade incondicionais.

Aos meus avós

Kikue e Takashi Tanaka

Alda e Antenor Peresi (in memoriam)

Por serem exemplos de esperança, perseverança, trabalho, honestidade e amor.

Por me darem as pessoas mais preciosas da minha vida.

Pelo amor incondicional.

À minha orientadora

Professora Dra. Jussara Marcondes Machado

Por me aceitar e acreditar na minha capacidade para desenvolver este trabalho. Obrigada pela oportunidade e por sua confiança em mim depositada.

Por todo o incentivo e paciência, mesmo nas horas mais difíceis, sempre me mostrando a direção a ser tomada e acrescentando para o meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal.

Por ser um exemplo de dignidade, honestidade e trabalho, que irei carregar comigo por toda vida.

Fica aqui o meu muito obrigada e eterna admiração!

Aos *Pacientes* atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Estado da Saúde de Bauru.

Por aceitarem participar deste trabalho.

Por acreditarem que poderiam fazer a diferença ao deixarem a sua contribuição para que os próximos possam ser beneficiados.

Agradeço pela confiança em mim depositada.



Agradecimientos

A *Deus* que sempre esteve presente me ajudando a ser cada dia melhor e mais forte para enfrentar as dificuldades, medos, angústias, alegrias e conquistas. Por estar em minha vida tornando-a mais serena e feliz.

À *Profª Drª Sueli Aparecida Calvi*, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela convivência, paciência e aprendizado no Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais. Pela colaboração neste trabalho, na elaboração, realização e por todas as sugestões efetuadas durante o exame de qualificação.

À pesquisadora *Sônia Maria Usó Ruiz Silva*, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao estatístico *Hélio Rubens de Carvalho Nunes*, do Grupo de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu e do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pela oportunidade em realizar este trabalho.

À secretária do Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, *Solange Sako Cagliari*, pela sua disposição, incentivo e momentos de descontração.

Ao secretário do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP *José Luis Alves* e ao *Anderson dos Santos Teixeira* e ao *Patrick de Araújo Domingues* pela ajuda, convívio e paciência.

A todos os docentes do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP em especial atenção ao *Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira* pelas valiosas sugestões dadas durante o exame de qualificação deste trabalho.

A todos os médicos e residentes do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP pelo auxílio durante o período de coleta das amostras.

A CAPES pelo auxílio e suporte financeiro, que viabilizou a execução deste trabalho.

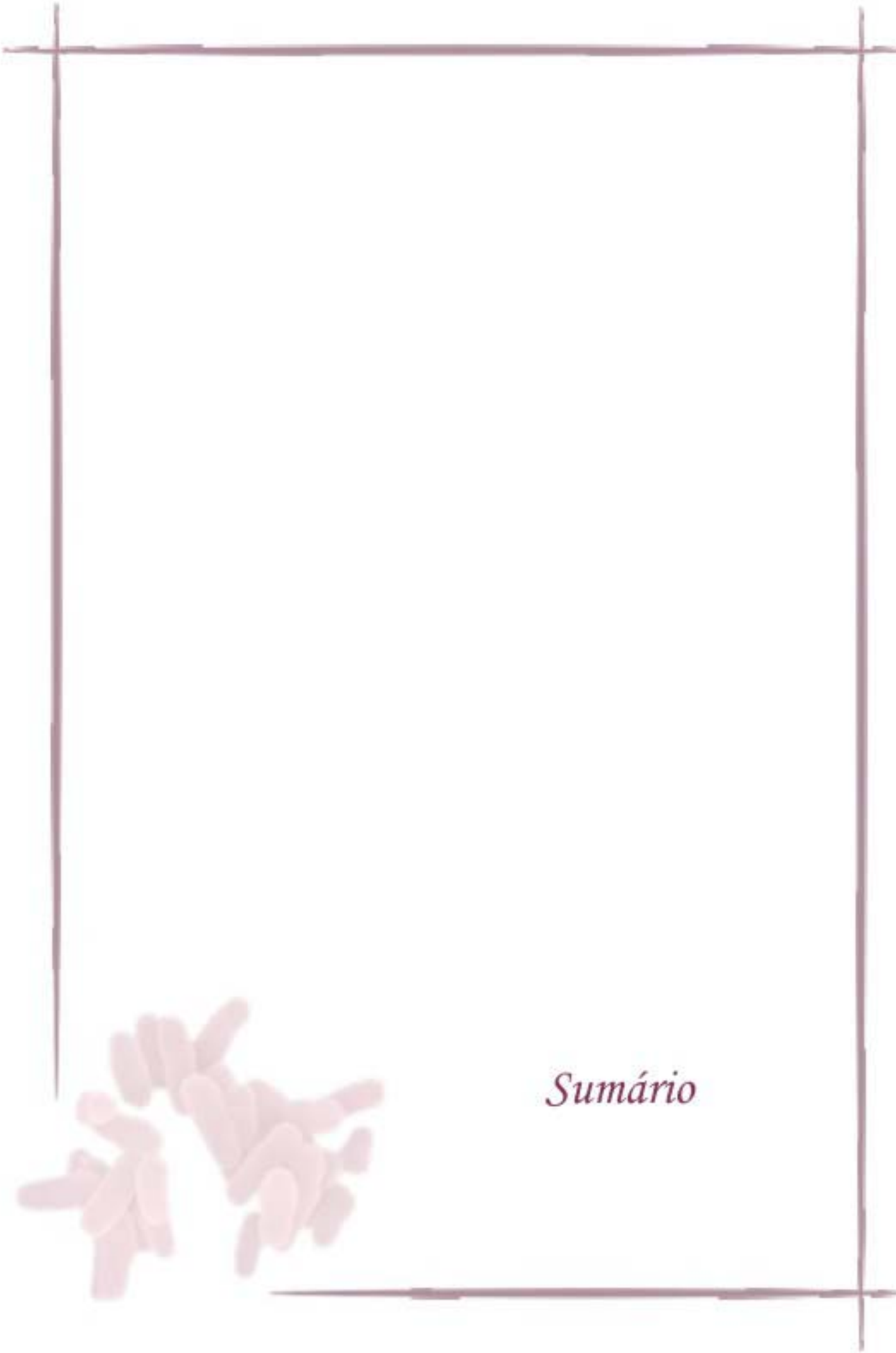
Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelas instruções durante a realização deste trabalho.

Às Bibliotecárias pela cordialidade e auxílio para todo o processo para a execução deste trabalho.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, *André, Carlinhos, Carlito, Cristina, Daniela, Gláucia, Fabiana Moura, Fabiana, Izolína, Larissa, Lidiane, Mariele, Priscilla, Renata, Rodrigo, Talísia e Thais*, pela paciência, ajuda e especialmente pelo agradável convívio e amizade que tornou a execução deste trabalho muito prazerosa e muitas vezes divertida.

A todos os amigos que me ajudaram neste período, em todos os momentos, tanto os difíceis, quanto os alegres. Pelo seu suporte, amizade e alegria que me proporcionaram. Em especial ao *Carlos Eduardo (Karnegão)* pelos momentos em que dividimos nossa paixão pela música e à amiga *Rosana Cheffer*, pela amizade de longos anos.

A minha família *Pró=Vida*, pelos ensinamentos, crescimento e alegrias que fizeram de mim uma pessoa melhor, mais paciente, compreensiva e amiga. Em especial ao *Dr. Celso Charuri* (*in memoriam*), pelos seus princípios, que tornaram tudo isso possível.



Sumário

I - Introdução.....	1
1. Tuberculose.....	2
2. Imunidade contra o <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
3. Marcadores inflamatórios.....	8
4. Justificativa.....	12
 II - Objetivo.....	 13
 III - Casuística e métodos.....	 15
1. Casuística.....	16
2. Métodos.....	16
2.1. Formação dos grupos de estudo.....	16
2.2. Diagnóstico de tuberculose.....	17
2.3. Tratamento.....	19
2.4. Determinação das citocinas.....	19
2.5. Análise estatística.....	20
 IV - Resultados.....	 22
Caracterização dos pacientes com tuberculose pulmonar.....	23
Avaliação dos marcadores inflamatórios.....	25
Avaliação das citocinas.....	33
Correlação entre os marcadores inflamatórios e as citocinas.....	49
 V - Discussão.....	 54
 VI - Conclusão.....	 67
 VII - Referências Bibliográficas.....	 69
 Resumo.....	 91
 Abastract.....	 95
 Apêndices	

I - Introdução



1. Tuberculose

O *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) é uma bactéria intracelular, de disseminação aérea, transportada por gotículas de saliva expelidas pela tosse, fala ou espirro dos doentes. O contágio se dá com maior frequência pelas vias respiratórias, e o bacilo se aloja no pulmão. ⁽¹⁾ A partir daí, espalha-se pela linfa ou pelo sangue, para outras partes do organismo, principalmente para o ápice pulmonar e os linfonodos regionais, pois, como aeróbio estrito, é onde encontra altas concentrações de oxigênio. A tuberculose extrapulmonar ocorre na pleura, sistema linfático, ossos, sistema gênito-urinário, meninges, peritônio ou pele, e corresponde a cerca de 15% dos casos.

⁽¹⁾ Após a infecção primária, podem ocorrer três desfechos: controle na porta de entrada graças à imunidade inata, doença ativa e tuberculose latente, em que o bacilo permanece por tempo indefinido, contido pelas células de defesa. ⁽²⁾

Durante o estado de latência, há controle, mas não eliminação da infecção. O *M. tuberculosis* fica dormente, replicando intermitentemente e com metabolismo alterado, o que gera um reservatório enorme de micobactérias. A diminuição da imunidade, em situações de desnutrição, subnutrição, estresse ou presença de outras condições mórbidas, como a aids, pode levar à reativação. Quando isso ocorre e a doença se desenvolve, há graves lesões no tecido, ocasionadas pelas próprias defesas do organismo que tenta eliminar o bacilo. ^(1, 2)

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial, cerca de dois bilhões de pessoas, está contaminado pelo bacilo. ⁽³⁾ Em aproximadamente 5% dos indivíduos imunocompetentes, a infecção progride da forma latente para a forma ativa dentro de dois anos; em outros 5%, a infecção reativa mais tardiamente e 3,5% a 6,0% perderão a vida em virtude da doença. ^(4,5,6) Por outro lado, 90% dos imunocompetentes com infecção latente permanecem saudáveis, sem sintomas por toda a vida. ⁽⁴⁾ A cada ano, surgem oito milhões de novos casos de tuberculose e três milhões de pessoas morrem em decorrência da doença. No Brasil, existem mais de 50 milhões de indivíduos infectados, cerca de 90.000 casos novos são notificados por ano, mas calcula-se que este número possa ser de 130.000, em virtude da subnotificação. ⁽⁵⁾

Nos países desenvolvidos, com a transmissão sob controle desde o advento da terapia específica e a melhora das condições de vida dos seus habitantes, a tuberculose ressurgiu em meados de 1980. Esse ressurgimento, termo que não se aplica aos países subdesenvolvidos, pois estes não chegaram a controlar a disseminação da infecção, tem várias causas. Entre elas, está o advento da aids. O portador do HIV, uma vez infectado pelo bacilo, tem risco estimado de adoecimento de 7% a 10%, enquanto o não portador, de 10% durante toda a vida (0,3% ao ano). Ao desenvolver a forma ativa da doença, o portador de HIV transmite o bacilo para contactantes, como profissionais da saúde, companheiros de prisão e abrigos, o que aumenta exponencialmente a prevalência da tuberculose. ⁽²⁾

Outra causa importante do aumento no número de casos da doença foi o fluxo migratório a partir de regiões consideradas reservatórios da micobactéria, como África, América do Sul, América Central e Ásia, para os países desenvolvidos. ⁽²⁾

Todas essas causas caracterizaram a tuberculose como doença em plena expansão, levando a OMS a declará-la, em 1995, emergência sanitária mundial. ⁽²⁾

O diagnóstico presuntivo da tuberculose pulmonar se faz pelos dados clínicos e radiológicos e a confirmação do diagnóstico é obtida pela baciloscopia e cultura. A baciloscopia identifica os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), é um método rápido e barato, eleito pelos serviços de saúde pública, mas que apresenta baixa sensibilidade. A cultura tem alta sensibilidade, mas como a reprodução do bacilo é lenta, a definição do diagnóstico é realizada em quatro a oito semanas, tempo muito longo, que pode influenciar o controle da endemia, já que o diagnóstico e o tratamento precoces interrompem o ciclo de transmissão do agente. ⁽⁷⁾ No Brasil, aproximadamente 26,7% dos pacientes são tratados sem confirmação diagnóstica de tuberculose pulmonar, com base apenas no quadro clínico-radiológico. ⁽⁸⁾

A tuberculose é letal sem tratamento que, por ter duração longa, de aproximadamente seis meses, muitas vezes é interrompido pelo paciente, facilitando o desenvolvimento de cepas resistentes às drogas. ^(4,9) Existem atualmente quatro antimicrobianos de primeira linha, isoniazida, etambutol,

pirazinamida e rifampicina, razoavelmente efetivos no tratamento de indivíduos com tuberculose em atividade, porém, ineficientes durante o estágio latente da doença. ⁽¹⁰⁾ Além disso, mais de 50 milhões de pessoas no mundo já se encontram infectadas com cepas multirresistentes às drogas (CMR), e 15% dos casos de tuberculose são causados por essas cepas. ⁽¹¹⁾ A mortalidade pelas CMR é de 40% a 60%, que equivale à dos doentes não tratados. ⁽¹²⁾ Em muitos países, como a Rússia, nos campos de trabalho e nas prisões, os indivíduos infectados pelas CMR praticamente já não alcançam cura, o que pode tornar a tuberculose uma doença incontrolável no futuro. ^(11,13) No Brasil, a prevalência da tuberculose CMR é menor que 1%. ⁽¹⁴⁾

A rápida emergência de CMR, a falta de uma vacina de efeito universal e o constante aumento de indivíduos infectados com o HIV, em regiões do mundo consideradas desenvolvidas, têm aumentado a dificuldade de um tratamento efetivo dos indivíduos infectados e da eliminação da tuberculose humana. ⁽¹²⁾ O desenvolvimento de novas terapias antituberculose é de extrema urgência para a interrupção do círculo vicioso de reativação do estado de latência em um futuro próximo. ⁽¹⁰⁾

2. Imunidade contra o *M. tuberculosis*

A defesa inicial contra o *M. tuberculosis* envolve a interação de várias populações de células imunocompetentes, particularmente de macrófagos e linfócitos T, caracterizando a resposta imune contra a tuberculose como imunidade mediada por células. ⁽¹⁵⁾

Na tuberculose, os macrófagos realizam a fagocitose e também regulam a resposta imune contra o agente, auxiliados pelas citocinas, proteínas de baixo peso molecular. Assim, o *M. tuberculosis* induz o macrófago, as células dendríticas e as células T a secretarem Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), citocina importante para o controle da infecção ativa, por seu papel na inflamação local e ativação de macrófagos. ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾ Além do papel na defesa do infectado, o TNF- α pode ser um importante fator na imunopatologia da doença. ^(20,21) Elevadas quantidades dessa citocina estão presentes no foco da infecção e os monócitos de pacientes com tuberculose produzem mais TNF- α *in vitro* do que aqueles de doadores saudáveis. ^(22,23)

Após a fagocitose do *M. tuberculosis*, em que a interação macrófago-linfócito é mediada por citocinas, os linfócitos TCD4⁺ e células *Natural Killer* (NK) secretam Interferon- γ (IFN- γ), que é crítico para o controle da infecção pela micobactéria. Essa citocina ativa os macrófagos alveolares que passam a produzir intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio, os quais inibem o crescimento e promovem a morte da micobactéria, além de Interleucina-12 (IL-12), que amplifica essa via. ^(11,16,17,24-28) No entanto, uma vez dentro do macrófago, o *M. tuberculosis* tem a capacidade de persistir no compartimento fagossômico na forma latente, pela redução da acidificação e inibição da fusão do lisossomo, impedindo a ação das enzimas líticas. ^(10,11,16,17,28-30) Além das células citadas, linfócitos TCD8⁺, T $\gamma\delta$ e T reconhedores de antígenos lipídicos, apresentados por moléculas CD1 (TCD1 restritas), também são secretores de IFN- γ e têm propriedades citotóxicas. ⁽³¹⁻³⁴⁾

As citocinas se ligam a receptores específicos de membrana das células-alvo, em geral com grande afinidade, enviando sinais que alteram a expressão dos genes nessas células e mediando efeitos biológicos complexos de interação entre linfócitos, células inflamatórias e hematopoiéticas, extremamente importantes para o desenvolvimento de resposta imune efetiva. As citocinas encontradas no sangue periférico determinam o perfil de células T *helper* presentes no paciente, definindo qual deles predomina, Th1 ou Th2, o que pode indicar a fase da infecção. ^(32,34-36) As células Th1 produzem principalmente IFN- γ e Interleucina-2 (IL-2), e as células Th2, Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10). As células Th1 e Th2, ainda, parecem ser derivadas de uma célula T precursora comum, com capacidade de se diferenciar em qualquer dos dois subtipos. ^(32,37) Essa diferenciação, provavelmente, envolve um estágio intermediário, designado de célula Th0, que é capaz de secretar tanto IFN- γ , quanto IL-4. ^(33,34,37) A secreção, pelas células Th1, de IL-2 e IFN- γ , que promove reações de defesa mediadas por macrófagos e outros fagócitos, é responsável pela morte intracelular de patógenos. ^(32,33,37)

A célula TCD8⁺ é capaz de secretar citocinas, como o IFN- γ e a IL-4, regulando o equilíbrio entre as células Th1 e Th2 no pulmão dos pacientes com tuberculose. O mecanismo pelo qual as proteínas produzidas pela micobactéria ativam a molécula de MHC classe I ainda não é completamente compreendido.

⁽¹⁾ Estas células lisam os macrófagos infectados pela secreção de perforinas e granzimas, liberando as bactérias em estado latente dentro dos fagossomas, deixando-as suscetíveis ao ataque de macrófagos recém-ativados. ^(38,39) As micobactérias também podem ser liberadas após o macrófago sofrer apoptose, devido à interação com a célula T citotóxica, via Fas / FasL. ⁽⁴⁰⁾

Células T $\gamma\delta$ reativas ao *M. tuberculosis*, encontradas no sangue periférico de indivíduos saudáveis e reatores ao derivado protéico purificado (PPD) do *M. tuberculosis*, são citotóxicas para monócitos que tiveram contato com antígenos micobacterianos e também secretam citocinas que são importantes para a formação do granuloma. ⁽⁴⁰⁾ Células T $\gamma\delta$ são mais freqüentes em pacientes imunocompetentes do que em imunossuprimidos. ^(41,42)

O grupo de células TCD1 restritas, expressando CD8, também lisa macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis*, introduzindo grânulos citotóxicos na célula através de poros mediados pela perforina. ⁽⁴³⁾ Por meio da molécula de CD1, lipídios ou glicolipídios são apresentados às células T. ⁽¹⁾

Apesar da ação de todos esses mecanismos de defesa, o bacilo sobrevive e se multiplica no macrófago, fazendo com que células mononucleares, como os linfócitos T, grandes produtores de IFN- γ e TNF- α , sejam recrutadas para a formação do granuloma no foco da infecção. ⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾ Durante este processo, os BAARs resistentes podem ser visualizados no interior dos macrófagos pela coloração de Ziehl-Neelsen. ⁽⁴⁹⁾ O granuloma aumenta de tamanho, à medida que ocorre o recrutamento de mais células e a área central torna-se necrótica com a morte dos macrófagos infectados, a ativação do sinal de apoptose para as células T e a ação das enzimas lisossômicas que lesam o tecido. ^(32,49-56) A área de necrose caseosa é circundada por células mielóides, células gigantes multinucleadas e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Conforme esta área se solidifica, o bacilo, antes visível, desaparece e a lesão calcifica e é reabsorvida, ou permanece em estado de liquefação. ⁽⁴⁹⁾ O *M. tuberculosis* se replica exponencialmente nestas áreas de necrose liquefeita. Se ocorrer a ruptura da lesão para as vias aéreas, os bacilos podem atingir outras áreas do próprio pulmão infectado, ou serem expelidos para o ambiente, infectando novos indivíduos. ^(32,52-57)

A constante produção de citocinas inflamatórias essenciais, como TNF- α e IFN- γ , assim como outros produtos bactericidas, incluindo reativos do nitrogênio e do oxigênio, gerados pelos macrófagos e células efectoras imunes ao redor, parece ser o fator chave para a latência do *M. tuberculosis* no granuloma. ^(58,59)

Apesar do efeito protetor da resposta Th1 contra a tuberculose, algumas citocinas, como o TNF- α , estão correlacionadas com a imunopatogenia da doença. ^(60, 61) A destruição tecidual relaciona-se com a elevação da expressão desta citocina e, para limitar esta ação deletéria, a produção sistêmica é suprimida e há elevação de receptores solúveis que bloqueiam sua atividade. ^(26,61-65) Assim, a tuberculose em atividade associa-se com diminuição de resposta Th1 e aumento de produção e ação de citocinas supressoras de perfil Th2, como TGF- β e IL-10, que agem desativando macrófagos, modulando as citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a função apresentadora de antígenos da célula T. Na presença da IL-10, tanto a proliferação das células, quanto a produção de IFN- γ são inibidas, sendo que a IL-10 também compromete os mecanismos microbicidas dos macrófagos e a apresentação de antígenos. ⁽⁶⁶⁻⁷²⁾ Como citocina antiinflamatória, a IL-10 relaciona-se ao aumento da gravidade da doença, pela inibição da resposta imune protetora. A desativação dos macrófagos, por efeito de sua ação, faz-se pela inibição de moléculas co-estimuladoras e da síntese de citocinas. ⁽⁷³⁾ Previne danos teciduais, pela regulação da inflamação e da apoptose, tendo efeito contrário ao do TNF- α . Sua produção pelos macrófagos é estimulada por componentes da parede celular micobacteriana. ⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾

O Fator β de Crescimento e Transformação (TGF- β), citocina supressora do perfil Th1, produzida pelos macrófagos, também participa na indução da fibrose em diferentes modelos experimentais de lesão pulmonar, incluindo a inflamação produzida pelo *M. tuberculosis*. ^(78,79) A ação pró-inflamatória e antiinflamatória do TGF- β depende de sua concentração, e esta ação se dá pela inibição da produção de IFN- γ pelas células TCD4⁺. Em baixas concentrações, atua como fator quimiotático para monócitos e induz a secreção de Interleucina-1 α (IL-1 α) e TNF- α . ⁽⁸⁰⁾ Sua produção aumenta, tornando-se máxima durante a fase crônica da tuberculose, iniciando um processo antiinflamatório e de regeneração. Essa elevação do TGF- β causa a

progressão e cronicidade da doença, ocorrendo diminuição da hipersensibilidade observada em pacientes e animais experimentais com tuberculose avançada. ^(81,82) O TGF- β , em alta concentração, desativa macrófagos, inibe a expressão e funcionamento de receptores para IFN- γ , IL1- α e IL-2 e diminui a produção do TNF- α , eventos paralelamente relacionados com aumento do crescimento micobacteriano intracelular; ainda, inibe a proliferação de células TCD4⁺, induz a expressão de receptores CD8 e aumenta a produção de citocinas do perfil Th2, como IL-10. ^(61, 83-88)

Rojas et al., ⁽⁶⁶⁾ estudando células TCD4⁺ ativadas pelo *M. tuberculosis*, não observaram efeito sinérgico entre TGF- β e IL-10. Relatam, no entanto, inibição da resposta das células TCD4⁺ ao *M. tuberculosis* por ambas citocinas, porém, por diferentes mecanismos de ação.

Hirsch et al., ⁽⁸⁵⁾ empregando cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos com tuberculose, observaram aumento significativo na produção de IFN- γ , na presença de anticorpos anti-TGF- β , comprovando o efeito imunomodulador dessa citocina.

3. Marcadores inflamatórios

Em resposta a diferentes tipos de agressão química, física ou biológica, o organismo estrutura um processo inflamatório local, necessário para cura e reconstituição dos tecidos afetados. Na fase aguda da inflamação, ocorrem alterações vasculares, humorais, neurológicas e celulares, manifestando-se por dor, calor, rubor, edema e perda de função. A síndrome da resposta de fase aguda (RFA), correspondente sistêmico da inflamação, é definida pelas alterações metabólicas, neuro-humorais e imunológicas decorrentes da ativação de macrófagos e aumento da produção de citocinas e outros mediadores. Clinicamente, a RFA se caracteriza por febre, anorexia, equilíbrio hídrico positivo, leucocitose, anemia, hiperglicemia, hipoalbuminemia, balanço nitrogenado negativo e aumento da VHS. ^(89,90)

Independente da causa desencadeante, na RFA ocorre aumento da síntese hepática e, conseqüentemente, dos níveis séricos das proteínas de fase aguda (PFA), que se alteram de forma proporcional à intensidade da agressão e da destruição tecidual. ⁽⁹⁰⁾ Pelo comportamento desses mediadores

no sangue periférico, portanto, pode-se aferir a imunopatogenia dos processos infecciosos. ⁽⁹¹⁾

Mudanças nas concentrações das PFA, febre, leucocitose, alterações na permeabilidade vascular e um aumento da resposta metabólica são componentes da imunidade inata mediada por citocinas, como Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e TNF- α . ⁽⁹²⁾ São exemplos dessas substâncias α_1 -antitripsina, α_1 -glicoproteína ácida (AGA), haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e proteína C-reativa (PCR). Na tuberculose em atividade, ocorre uma forte reação de fase aguda. ⁽⁹¹⁾

A família das PFA é constituída por aproximadamente trinta proteínas plasmáticas produzidas em quantidade elevada pelo fígado durante a inflamação. ⁽⁹³⁾ A regulação da produção das PFA é complexa e o tipo de resposta é determinado pela presença de diversos mediadores, divididos em quatro grupos: dois representados pelas citocinas, que atuam como ativadores primários e outros dois considerados moduladores ou co-fatores. ^(92,94) O grupo de citocinas IL-1, que envolve a IL-1 e o TNF- α , induz a produção de PFA tipo 1, como a AGA, enquanto que a família de citocinas IL-6, que abrange IL-6 e Interleucina-11 (IL-11), entre outras, induz a síntese de PFA tipo 2, grupo de proteínas representadas pelo fibrinogênio. Geralmente, a IL-1 α ou o TNF- α não têm efeito sobre a produção das PFA tipo 2, ao contrário do grupo de mediadores da família IL-6, que pode induzir e aumentar sinergicamente a produção de PFA tipo 1. ^(92,94) Interleucina-1 α , TNF- α e IL-6 são capazes de diminuir a transcrição do gene para albumina, considerada uma PFA negativa. ⁽⁹⁵⁾ Os dois grupos de mediadores que modulam a expressão das PFA induzidas pelas citocinas são os hormônios, principalmente os glicocorticóides e os fatores de crescimento, como o TGF- β . ^(92,94) Os glicocortilóides podem estimular diretamente a produção de algumas PFA, mas sua principal atuação é agir de forma sinérgica com as citocinas. ^(95,96) O TGF- β aumenta o efeito da IL-6 sobre alguns genes de PFA, possivelmente estimulando a expressão do receptor da IL-6. ⁽⁹²⁾

A importância dessas proteínas plasmáticas para o organismo se explica pela necessidade de inibidores enzimáticos que neutralizem enzimas proteolíticas liberadas pelos leucócitos; de proteínas transportadoras

(haptoglobina, PCR), que auxiliem na coleta e no transporte de restos celulares e produtos de degradação, até células fagocíticas, a fim de que sejam processados e armazenados para reaproveitamento (por exemplo, o ferro da hemoglobina); de cicatrização de lesões, que pede uma grande quantidade de fibrina vinda da circulação sob a forma de fibrinogênio. Dessa forma, a resposta humoral, com produção de reagentes de fase aguda, deve ser encarada como um fenômeno estimulado para conter a extensão da lesão toda vez que necessário, mesmo que nem todos os seus componentes sejam utilizados em cada situação. ⁽⁸⁸⁾ As proteínas de fase aguda são úteis tanto na fase de diagnóstico, como na monitorização da evolução dos pacientes, já que podem ser quantificadas de maneira seriada. ⁽⁸⁸⁾

A α_1 -glicoproteína ácida (AGA) é uma proteína plasmática sintetizada pelo fígado e secretada principalmente pelos hepatócitos, sendo a expressão de seu gene modulada pela IL-1, IL-6 e por glicocorticóides, no homem, em camundongos e coelhos. ⁽⁹⁷⁻¹⁰¹⁾ Recentemente foi demonstrado que a IL-8 também pode aumentar a produção desta proteína em hepatócitos humanos isolados. ⁽¹⁰²⁾ Além das citocinas e dos glicocorticóides, o ácido retinóico também está envolvido com a produção de proteínas de fase aguda. No que diz respeito à AGA, o ácido aumenta a resposta da IL-6, porém, atua de forma negativa na modulação de mRNA da AGA induzida pelos glicocorticóides. ^(102,103)

A proteína C-reativa (PCR) é considerada o marcador mais sensível e específico da resposta de fase aguda. ⁽¹⁰⁴⁾ É o primeiro a ter os níveis aumentados, quando há lesão, e também aquele que mais rapidamente atinge a normalidade, após a intervenção terapêutica. ⁽¹⁰⁵⁾ Como pode ter elevações até mil vezes acima do limite da normalidade, esta substância pode ser mais útil que outros marcadores de fase aguda que geralmente têm aumentos mais modestos. ⁽⁹⁶⁾ Este é um exame laboratorial mais sensível por possuir uma relação temporal muito estreita com os níveis de IL-6 e outros marcadores da inflamação como o fibrinogênio. ⁽⁹⁰⁾ É produzida pelos hepatócitos, principalmente sob o controle transcricional da IL-6, sendo que sua concentração no plasma reflete diretamente a intensidade do processo patológico. ⁽¹⁰⁶⁾

Todos esses marcadores, até aqui citados, encontram-se na fração das globulinas na eletroforese das proteínas plasmáticas. As globulinas são convencionalmente divididas em quatro frações: α , α_2 , β e γ e desempenham numerosas funções no plasma, sendo responsáveis pela imunidade natural e adquirida do indivíduo contra microrganismos invasores. São formadas no fígado (50% a 80%) e nos tecidos linfóides. ⁽¹⁰⁷⁾

As γ -globulinas são proteínas dos anticorpos ou imunoglobulinas, divididas nas frações G, A e M e são produzidas pelas células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, do fígado, ou, em sua maioria, dos tecidos linfóides. ⁽¹⁰⁵⁾

O aumento na síntese de proteínas de fase aguda é acompanhado pela diminuição de outras, chamadas de proteínas de fase aguda negativas, como a albumina, cujos valores diminuem na presença de citocinas inflamatórias. ^(108,109)

A velocidade de hemossedimentação (VHS) é utilizada por muitos especialistas, como os infectologistas, para sugerir ampla variedade de condições clínicas, na avaliação da gravidade de doenças e até como um índice geral de saúde. ⁽¹¹⁰⁾ É um teste inespecífico na documentação de processo inflamatório, infeccioso ou neoplásico, servindo também para a inferência de sua intensidade e, considerando-se as limitações, da resposta à terapêutica. ⁽⁹⁰⁾

Constitui, portanto, um marcador de fase aguda que traduz maior agregação das hemácias, resultante dos processos inflamatório e necrótico, como consequência da necessidade, no sangue, de proteínas de fase aguda. Quanto maior a velocidade de assentamento das hemácias, maior a VHS. ⁽¹¹¹⁾ A sua aceleração pode ser favorecida pela elevação no nível de fibrinogênio e, menos freqüentemente, das α_2 , β e γ -globulinas. Essas proteínas diminuem a carga negativa dos eritrócitos (potencial zeta), que os mantém separados, levando à formação de um complexo que sedimenta com maior velocidade do que as células, isoladamente. A remoção do fibrinogênio, pela desfibrinação, diminui a VHS. ⁽¹⁰⁵⁾

A determinação de VHS não é teste diagnóstico para qualquer doença, mas é muito útil para monitorizar a progressão de doenças inflamatórias, como a tuberculose. ⁽¹¹¹⁾

4. Justificativa

O principal suporte para o controle da tuberculose é a rápida e apurada identificação dos indivíduos infectados para início imediato do tratamento. O método diagnóstico mais utilizado é a bacterioscopia de escarro, em que bacilos são demonstrados pela microscopia óptica. Entretanto, mesmo na forma pulmonar, 40% a 60% dos pacientes têm baciloscopia negativa. ⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾ Nesses casos, a presunção diagnóstica é realizada pela história clínica, pelos antecedentes epidemiológicos e exames de imagem, sendo, também, utilizados marcadores de fase aguda inflamatória, freqüentemente alterados nos processos granulomatosos como resultado da imunopatogenia.

As citocinas têm papel fundamental na organização local do processo inflamatório tuberculoso, sendo também responsáveis pela indução das proteínas de fase aguda inflamatórias. Desta forma, a alteração dos níveis dessas proteínas no sangue periférico, juntamente com marcadores clínico-epidemiológicos e de imagem, sugestivos de tuberculose, pode ser tomada como doença em atividade, mesmo com bacterioscopia de resultado negativo, permitindo que se proponha um teste terapêutico e diminuindo o tempo de transmissão do bacilo pelo doente. Além disso, a involução da atividade sérica dessas proteínas, reflexo da diminuição de produção das citocinas, pode ser tomada como resposta ao tratamento, evitando que ele seja descontinuado enquanto houver evidência de atividade inflamatória.



II - Objetivo

1. Objetivo geral

Avaliar a ação do tratamento no processo inflamatório tuberculoso em pacientes com a forma pulmonar do adulto.

2. Objetivos específicos

Avaliar o comportamento antes, aos três meses e ao final do tratamento antituberculose:

1. Dos marcadores de fase aguda do soro: proteínas totais, albumina, globulinas, α 1-glicoproteína ácida (AGA), proteína C-reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação (VHS).

2. Das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , da antiinflamatória IL-10 e da regulatória TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico.

III - Casuística e Métodos



1. CASUÍSTICA

Foram estudados 28 doentes com tuberculose pulmonar, atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Estado da Saúde de Bauru. Como controles normais, foram estudados 20 doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Foram incluídos apenas os pacientes e os doadores de sangue que concordaram em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2. MÉTODOS

2.1. Formação dos grupos de estudo

Foram formados dois grupos:

Grupo 1 (G1 – 20 indivíduos): grupo controle, constituído por indivíduos normais, com média etária de 38,5 anos, idade mínima de 24 anos e máxima de 56 anos, todos do sexo masculino, doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, sem queixas clínicas. Estes indivíduos foram avaliados apenas uma vez, para estabelecer o padrão de normalidade das variáveis estudadas.

Grupo 2 (G2 – 28 doentes): formado por 13 doentes com tuberculose pulmonar, atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e por 15 doentes atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Estado da Saúde de Bauru. Estes doentes tinham tuberculose pulmonar de intensidade

moderada e foram arrolados no estudo à medida que se apresentavam aos serviços de saúde para diagnóstico e tratamento de. Foram estudados 23 indivíduos do sexo masculino, com média etária de 54,34 anos, idade mínima de 21 anos e máxima de 77 anos e 5 indivíduos do sexo feminino, com média etária de 43,4 anos, idade mínima de 29 anos e máxima de 74 anos.

Os critérios de inclusão no estudo: idade maior ou igual a 18 anos, ambos os sexos, diagnóstico de tuberculose pulmonar comprovado por baciloscopia ou cultura positivas para *M. tuberculosis* ou, então, por quadro clínico-epidemiológico, exames laboratoriais e de imagem compatíveis com tuberculose em atividade. Foram excluídos todos os pacientes com tuberculose pulmonar concomitante à outra doença granulomatosa em atividade ou à sorologia positiva para HIV.

Todas as variáveis estudadas foram determinadas em três momentos nos doentes: **M1** – após o diagnóstico e antes do tratamento antituberculose; **M2** – aos três meses de tratamento; **M3** – ao final do tratamento antituberculose (aos seis meses).

2.2. Diagnóstico de Tuberculose:

2.2.1. Baciloscopia

Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços de amostras seriadas de escarro, realizada na rotina da Seção de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e no Instituto Adolfo Lutz de Bauru. Após a descontaminação do material, pelo método de Petroff modificado, a amostra era centrifugada, utilizando-se o sedimento para a confecção dos esfregaços, com área aproximada de 2cm x 2cm. Após secagem em temperatura ambiente, foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, com fucsina fenicada e azul de metileno a 0,3%, conforme as normas do Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde. ⁽¹¹⁵⁾ As lâminas coradas foram submetidas à microscopia óptica em objetiva de imersão, sendo observados de 100 a 300 bacilos /campos.

2.2.2. Exame histopatológico

Determinação por exame histopatológico do bacilo álcool-ácido resistente, em material de lesão colhido por equipe médica, em dois doentes atendidos na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, foi realizada no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Também foi colhido material de lesão de um doente atendido no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Estado da Saúde de Bauru, examinado no Hospital Estadual Bauru. O exame histopatológico foi realizado porque o exame baciloscópio foi negativo e havia necessidade de se estabelecer diagnóstico diferencial com outra etiologia.

2.2.3. Exames de Imagem

Exames de imagem, como raio-X simples e tomografia computadorizada, fazem parte da rotina de conduta diagnóstica dos casos com suspeita de tuberculose, e foram realizados segundo indicação médica. Os exames de imagem foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e o raio-X dos pacientes atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Estado da Saúde de Bauru foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Manoel de Abreu e do Hospital de Base de Bauru.

2.2.4. Marcadores inflamatórios

A determinação quantitativa das proteínas totais e da albumina foi realizada pelo método colorimétrico, em aparelho do modelo Vitrus 950, marca *Johnson e Johnson*. A determinação quantitativa da PCR foi realizada pelo método de imunocinética de ponto fixo, em aparelho do modelo Vitrus 950, marca *Johnson & Johnson*. A determinação quantitativa da α 1-glicoproteína ácida foi realizada pelo método turbidimérico, em aparelho do modelo Cobas Mirar S, da marca *Roche*. Todos estes exames foram realizados no Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

A determinação da velocidade de hemossedimentação, utilizando-se o método de Westergreen, foi realizada no Laboratório de Hematologia do

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e pelo Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru.

2.3. Tratamento

O tratamento antituberculose foi realizado nos doentes com doença confirmada por baciloscopia de escarro. Quando não se conseguiu demonstrar o bacilo, o tratamento foi introduzido nos pacientes com quadro clínico-epidemiológico e de imagem sugestivos de tuberculose em atividade e com alteração dos marcadores inflamatórios, como as proteínas de fase aguda, indicativos de doença em atividade ou, ainda, com presença de granuloma em exame histopatológico. O tratamento dos pacientes foi realizado durante seis meses, utilizando-se diferentes combinações entre as quatro drogas de primeira linha: isoniazida, etambutol, pirazinamida e rifampicina.

2.4. Determinação das citocinas.

2.4.1. Coleta de sangue

Para a determinação dos níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de células do sangue periférico, nos grupos controle e de doentes com tuberculose pulmonar, nos três momentos, foram colhidas amostras de 20 ml de sangue da veia do antebraço, com observação das condutas-padrão de antisepsia.

2.4.2. Obtenção de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Histopaque^R (116). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) por mais 5 minutos a 200g. Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. USA), 40ug/ml de gentamicina e 10% de soro autólogo humano inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC), sendo a identificação e viabilidade das mesmas realizadas pela contagem com

Turk (alíquotas de 50µl da suspensão celular são incubadas a 37°C durante 10 minutos com 50µl da solução do corante a 5%), para células mononucleares totais, e pela incorporação do vermelho neutro (alíquotas de 50µl da suspensão celular são incubadas a 37°C durante 10 minutos com 0,45ml da solução do corante a 0,02%), para contagem de monócitos. A seguir, a suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 24 orifícios, com concentração de 2×10^6 /ml. A cultura de células totais foi incubada na presença ou não de estímulo. Para isolamento de monócitos, após uma hora de incubação a 37° C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram eliminadas pela lavagem das placas com meio de cultura RPMI. Em seguida, as células foram novamente incubadas em MCCC, na presença ou não de estímulos.

2.4.3. Obtenção de sobrenadantes

As células mononucleares totais (2×10^6 /ml) e monócitos (2×10^6 /ml), obtidas conforme descrito no item anterior, foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% CO₂, na ausência ou presença de 8µg/ml de fito-hemaglutinina (PHA) ou 20µg/ml de lipopolissacarídeo (LPS), respectivamente. Após 24 horas, os sobrenadantes foram aspirados, e alíquotas desse material foram conservadas a -80°C até o momento de sua utilização para dosagem das citocinas.

2.4.4. Dosagem de citocinas

As dosagens das citocinas TNF-α, IFN-γ, TGF-β e IL-10 foram realizadas pela técnica de ELISA, utilizando *kits* comerciais (R & D Symstems), de acordo com as indicações do fabricante. O limite de detecção para cada citocina foi de 5 pg/ml.

2.5. Análise estatística:

Em G1, foram anotadas as variáveis em um único momento e esses valores foram utilizados como padrão de referência. Em G2, as variáveis foram anotadas em três momentos: M1 – antes; M2 – aos três meses; M3 – ao final do tratamento antituberculose. As variáveis consideradas neste estudo foram arranjadas em dois agrupamentos: 1- **resposta inflamatória no sangue periférico** – velocidade de hemossedimentação, proteínas totais, albumina,

globulinas , α 1- glicoproteína ácida , proteína C- reativa; 2 - **citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico** - TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-10.

Os resultados obtidos ao longo do tempo, no doente sob tratamento, foram comparados. Para este fim foram utilizados: ANOVA para amostras dependentes ou Teste de Friedman para comparar os momentos em relação à resposta inflamatória no sangue periférico, seguido de Teste de Bonferroni ou Teste de Dunn para comparações múltiplas entre os momentos; Teste de Shapiro-Wilk e Teste de Levene para verificar normalidade e homocedasticidade; Intervalo de confiança para a média das variáveis cujo Teste de Shapiro-Wilk indicou distribuição normal; Testes t de Student ou Mann-Whitney para comparar os grupos G1 e G2 em relação às citocinas em cada momento; ANOVA para amostras independentes para comparar os momentos em relação às citocinas, seguido do Teste de Bonferroni para comparações múltiplas entre os momentos. A relação linear entre a resposta inflamatória no sangue periférico e as citocinas em cada momento foi estudada por meio das correlações de Spearman e Pearson. Todos os testes foram aplicados com nível de significância $\alpha = 0,05$.⁽¹¹⁷⁾

O presente estudo foi submetido a e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

IV - Resultados



A caracterização dos 28 doentes com tuberculose pulmonar estudados (G2) quanto ao gênero, idade e método de confirmação diagnóstica é apresentada no Quadro 1. Fizeram parte deste grupo 23 (82,14%) indivíduos do sexo masculino, com média de idade de 54,34 anos (21 anos - 77 anos) e 5 (17,86%) indivíduos do sexo feminino, com média de idade de 43,4 anos (29 anos - 74 anos).

O diagnóstico foi confirmado pela demonstração do agente em amostras de escarro ou em material de biópsia em 19 (67,86%) do total de 28 pacientes, sendo que, destes, nove (47,37%) também tinham exames de imagem compatíveis com tuberculose em atividade. Em nove (32,14%) dos 28 pacientes, a demonstração do agente não foi realizada. Destes nove pacientes, seis (66,66%) apresentavam exames de imagem (Rx ou TC) compatíveis com atividade tuberculosa e nos três (33,34%) restantes, o diagnóstico foi inicialmente presuntivo, pela observação do quadro clínico-epidemiológico e dos exames laboratoriais, como proteínas de fase aguda e VHS, e mais tarde foi confirmado pela resposta positiva ao tratamento específico.

Quadro 1. Caracterização dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2) estudados, quanto ao gênero, idade e método de diagnóstico.

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Diagnóstico		
			Demonstração Do agente	Exame Imagem	Outros
1	M	62	Baciloscopia +	**	
2	F	40	Baciloscopia -	TC	
3	M	52	Baciloscopia +	TC	
4	M	38	Baciloscopia -	**	T. T.
5	M	47	Baciloscopia +	RX	
6	M	70	Baciloscopia +	RX	
7	M	66	Baciloscopia + Biópsia +	TC	
8	M	32	**	**	T. T.
9	F	74	Baciloscopia + Biópsia +	**	
10	M	48	Baciloscopia +	RX	
11	M	35	Baciloscopia +	RX	
12	F	32	Baciloscopia +	**	
13	M	45	Baciloscopia +	**	
14	M	56	Baciloscopia +	**	
15	M	21	**	RX	
16	M	68	**	RX	
17	M	61	Baciloscopia +	**	
18	F	42	Baciloscopia +	**	
19	M	61	**	RX	
20	M	40	**	RX	
21	M	42	**	RX	
22	M	48	Baciloscopia +	**	
23	M	43	Biópsia +	RX	
24	F	29	Baciloscopia +	**	
25	M	42	**	**	T. T.
26	M	42	Baciloscopia +	**	
27	M	62	Baciloscopia +	RX	
28	M	77	Baciloscopia +	RX	

M: Masculino; F: Feminino; TC: Tomografia computadorizada; Rx: Raio X; T. T.: Teste terapêutico

** Dados não obtidos

A análise dos valores dos marcadores de fase aguda em relação ao valor de referência foi realizada apenas nos indicadores cujos dados se distribuíam de forma a permitir a aplicação da técnica estatística.

Na análise dos valores das globulinas (g/dl) dos doentes, apresentados em média e desvio padrão, nos três momentos, em relação aos valores de referência (2,8 a 3,2 g/dl) verificou-se em M1: 3,92 g/dl $\pm$ 0,72 (IC95%: 3,59 a 4,25); M2: 3,45 g/dl $\pm$ 0,49 (IC95%: 3,23 a 3,67); M3: 3,49 g/dl $\pm$ 0,43 (IC95%: 3,29 a 3,69). Portanto, nos três momentos os doentes apresentaram valores de globulina acima dos valores de referência (Figura 1).

Na análise dos valores das proteínas totais (g/dl), apresentados em média e desvio padrão, nos três momentos, em relação aos valores de referência (6,3 a 8,2 g/dl) verificou-se em M1: 7,92 g/dl $\pm$ 0,59 (IC95%: 7,65 a 8,15); M2: 7,49 g/dl $\pm$ 0,68 (IC95%: 7,18 a 7,80); M3: 7,67 g/dl $\pm$ 0,69 (IC95%: 7,36 a 7,98). Os valores obtidos dos doentes não foram diferentes dos valores de referência.

Quanto aos níveis de albumina dos doentes com tuberculose pulmonar, (G2) apresentados em mediana e quartis, foram encontrados em M1 = 3,90g/dl (3,40; 4,60); M2 = 4,20g/dl (3,75; 4,40); M3 = 4,30g/dl (3,85; 4,55), que não diferiram dos valores de referência (3,5g/dl a 5,0g/dl) (Tabela 1). Com relação à PCR, 22 (81,48%,) do total de 27 pacientes avaliados tinham valores acima do valor de referência ($\leq$ 1,00).

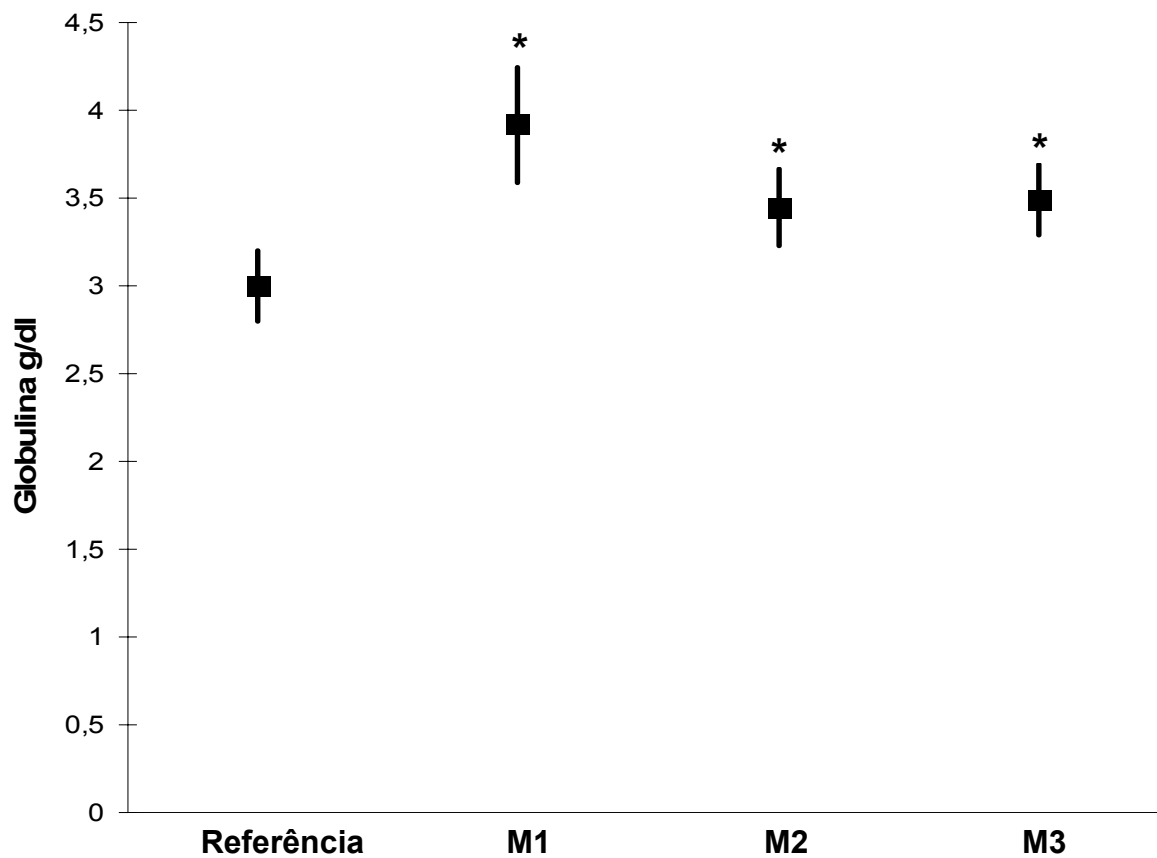


Figura 1. Comparação dos níveis séricos das globulinas dos doentes com tuberculose pulmonar antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose com os valores normais de referência.

Os valores da α 1-glicoproteína ácida (AGA) variam conforme o gênero, por isso homens e mulheres foram avaliados separadamente. Na análise dos valores da α 1-glicoproteína ácida (mg/dl) dos doentes do sexo feminino, apresentados em média e desvio padrão, nos três momentos, em relação aos valores de referência (40 a 120 mg/dl) verificou-se em M1: 127,5 mg/dl $\pm$ 92,78 (IC95%: 12,87 a 242,73); M2: 66,2 mg/dl $\pm$ 53,6 (IC95%: -0,20 a 132,60); M3: 43,98 mg/dl $\pm$ 7,57 (IC95%: 31,94 a 56,02). Somente os valores obtidos dos doentes antes do tratamento (M1) demonstraram aumento em relação ao intervalo de referência, mas nos outros momentos (M2 e M3) não houve diferença em relação aos valores de referência (Figura 2).

Na análise dos valores da α 1-glicoproteína ácida (mg/dl) dos doentes do sexo masculino, apresentados em média e desvio padrão, nos três momentos, em relação aos valores de referência (50 a 130 mg/dl) verificou-se em M1: 115,4 mg/dl $\pm$ 46,08 (IC95%: 90,86 a 139,94); M2: 67,44 mg/dl $\pm$ 26,69 (IC95%: 50,81 a 81,65); M3: 62,18 mg/dl $\pm$ 21,35 (IC95%: 50,81 a 73,55). Os valores obtidos dos doentes do sexo masculino não se mostraram diferentes do intervalo normal de referência.

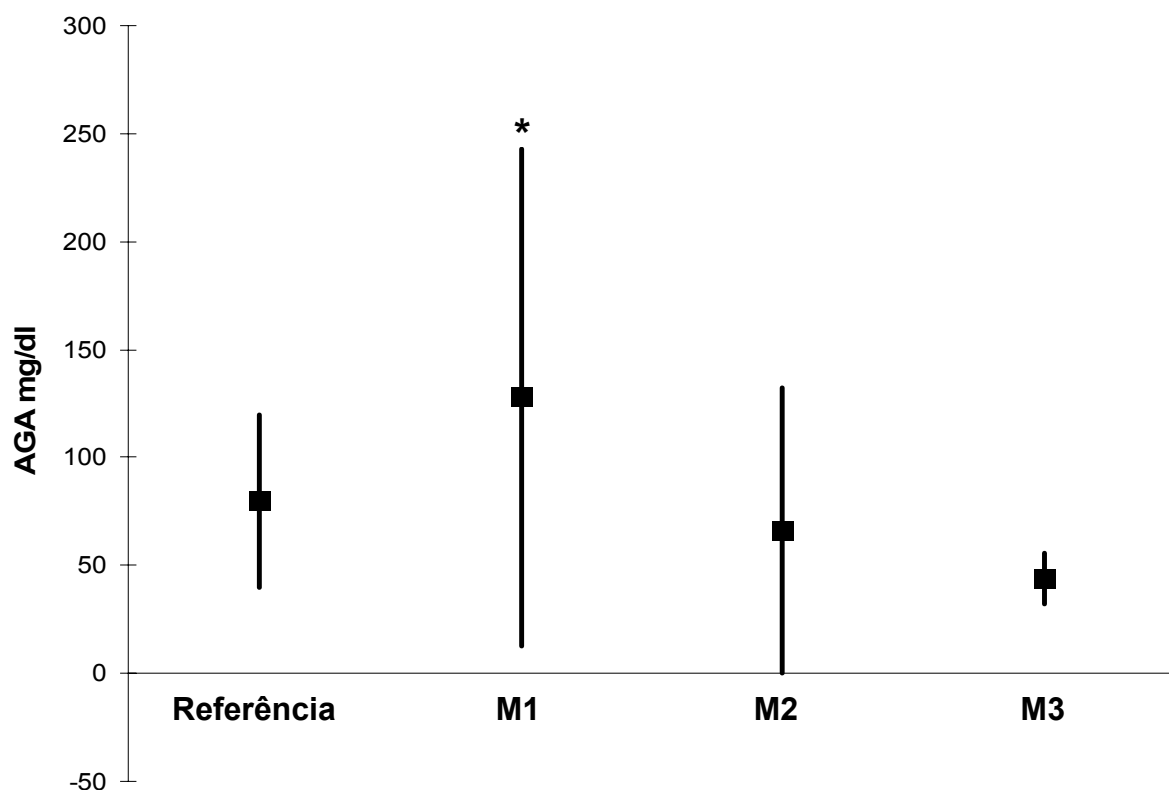


Figura 2. Comparação dos níveis séricos da α 1-glicoproteína ácida (AGA) (mg/dl) dos doentes do sexo feminino com tuberculose pulmonar antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose com os valores normais de referência.

Os valores do VHS também são avaliados conforme o gênero, então homens e mulheres foram estudados separadamente. Na análise dos valores do VHS (mm/h) dos doentes (G2) do sexo feminino, apresentados em média e desvio padrão, nos três momentos, em relação aos valores de referência (≤ 20 mm/h) verificou-se em M1: 65 mm/h $\pm$ 31,23 (IC95%: 26,31 a 103,69); M2: 20 mm/h $\pm$ 12,98 (IC95%: 3,92 a 36,08); M3: 19,33 mm/h $\pm$ 13,65 (IC95%: -2,37 a 41,03). Somente os valores obtidos dos doentes antes (M1) demonstraram

aumento em relação ao intervalo normal de referência. Os outros momentos (M2 e M3) não se mostraram diferentes dos valores normais de referência (Figura 3).

Na análise dos valores do VHS (mm/h) dos doentes do sexo masculino, apresentados em média e desvio padrão, nos três momentos, em relação aos valores de referência (≤ 10 mm/h) verificou-se em M1: 37,64 mm/h $\pm$ 28,61 (IC95%: 18,49 a 56,79); M2: 18,32 mm/h $\pm$ 13,38 (IC95%: 9,36 a 27,28); M3: 10,59 mm/h $\pm$ 7,41 (IC95%: 5,63 a 15,55). Os valores obtidos dos doentes antes (M1) e aos três meses (M2) foram maiores do que os normais de referência, enquanto que, em M3, não diferiram destes (Figura 4).

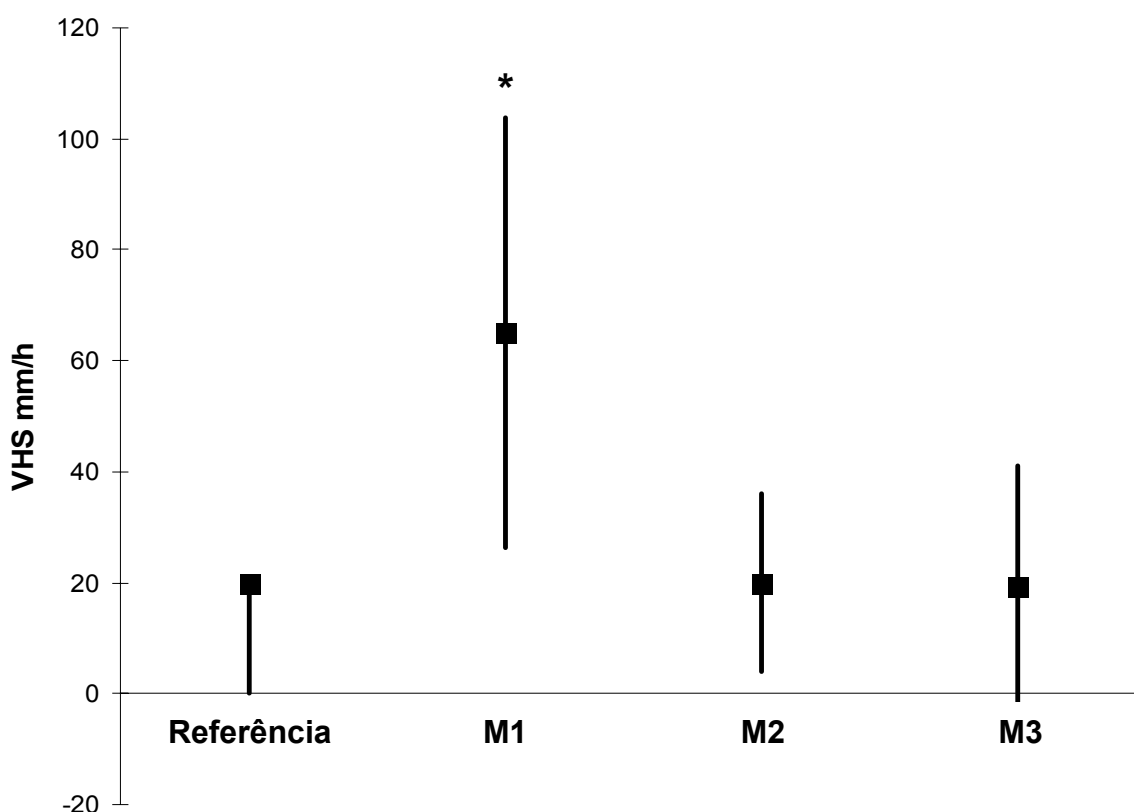


Figura 3. Comparação dos níveis séricos do VHS (mm/h) dos doentes do sexo feminino com tuberculose pulmonar antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose com os valores normais de referência.

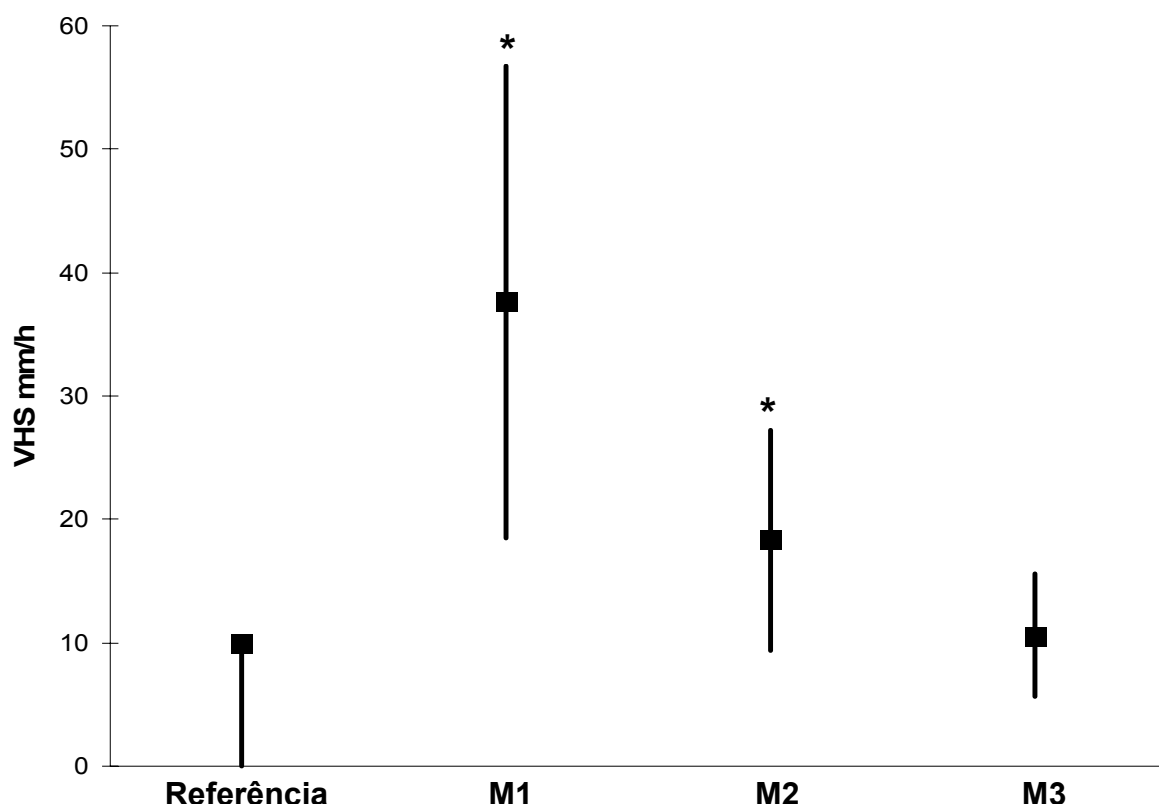


Figura 4. Comparação dos níveis séricos do VHS (mm/h) dos doentes do sexo masculino com tuberculose pulmonar antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose com os valores normais de referência.

Os valores das variáveis bioquímicas e hematológica de G2, avaliados antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose, são apresentados pela Tabela 1. Algumas dessas variáveis não foram realizadas em todos os momentos em alguns dos 28 doentes.

Em relação às proteínas totais e frações, determinadas em 21 dos 28 doentes, os valores de média e desvio padrão das globulinas estiveram significativamente aumentados ($p < 0,001$) em M1 ($3,92 \text{ g/dl} \pm 0,72$), quando

comparados a M2 (3,45 g/dl $\pm$ 0,49) e M3 (3,49 g/dl $\pm$ 0,43), não havendo diferença entre os níveis de M2 e M3 ($p>0,05$). Os valores de albumina, apresentados em medianas e quartis, não demonstraram diferença significativa ($p>0,05$) entre os três momentos avaliados: M1 = 3,90 g/dl (3,40; 4,60); M2 = 4,20 g/dl (3,75; 4,40); M3 = 4,30 g/dl (3,85; 4,55).

A PCR foi avaliada em 20 dos 28 indivíduos de G2, por meio de medianas e quartis, tendo como padrão de normalidade o valor de referência: ≤ 1 g/dl e teve níveis mais elevados significativamente ($p<0,0001$) em M1 = 3,65 g/dl (1,70; 6,60), quando comparado com M2 = 0,95 g/dl (0,30; 1,60) e M3 = 0,15 g/dl (0,00; 0,40). Os valores obtidos para M2 também foram significativamente mais elevados do que para M3 ($p<0,0001$).

Os resultados da $\alpha 1$ -glicoproteína ácida e do VHS, aqui apresentados em média e desvio padrão, são dependentes do gênero e por isso homens e mulheres foram analisados separadamente. Deste modo, em relação à $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, foram avaliados 16 dos 23 homens nos três momentos (M1, M2 e M3), as cinco mulheres em M1 e M2 e quatro mulheres em M3. Entre os homens, os valores da $\alpha 1$ -glicoproteína ácida eram maiores em M1 (115,40 mg/dl $\pm$ 46,08) do que em M2 (67,44 mg/dl $\pm$ 26,69) e em M3 (62,18 mg/dl $\pm$ 21,35) ($p<0,0001$). Não houve diferença significativa entre os valores de M2 e M3 no grupo dos homens e entre os momentos estudados no grupo de mulheres.

Quanto ao VHS, 11 dos 23 indivíduos do sexo masculino foram avaliados nos três momentos (M1, M2 e M3), as cinco mulheres em M1 e M2 e quatro, em M3. Os resultados, apresentados como média e desvio padrão na Tabela 1, demonstraram que, entre os homens, o VHS se encontrava mais elevado significativamente ($p<0,0016$) em M1 (37,64 mm/h $\pm$ 28,61) do que em M2 (18,32 mm/h $\pm$ 13,38) e M3 (10,59 mm/h $\pm$ 7,41). Não houve diferença significativa entre os valores de M2 e M3 no grupo dos homens. Em relação ao grupo de mulheres estudado, a comparação entre M1 (65,00 mm/h $\pm$ 31,23) e M2 (20,00 mm/h $\pm$ 12,98) demonstrou que os níveis de VHS se encontravam significativamente mais elevados em M1 ($p<0,025$).

Tabela 1. Comparação entre as variáveis bioquímicas (proteínas totais, albumina, globulinas, PCR e α 1-glicoproteína ácida) e hematológica (VHS) encontradas nos três momentos do tratamento específico de doentes com tuberculose pulmonar (G2): antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Variáveis		Momentos			p
		M1	M2	M3	
	PT (g/dl) (n=21) (vr: 6,3-8,2 g/dl)	7,92 $\pm$ 0,59	7,49 $\pm$ 0,68	7,67 $\pm$ 0,69	0,059 ⁽¹⁾
	Alb (g/dl) (n=21) (vr: 3,5-5,0 g/dl)	3,90 (3,40; 4,60)	4,20 (3,75; 4,40)	4,30 (3,85; 4,55)	0,331 ⁽²⁾
	Glob (g/dl) (n=21) (vr: 2,8-3,2 g/dl)	3,92 $\pm$ 0,72	3,45 $\pm$ 0,49	3,49 $\pm$ 0,43	0,001 ^{(1)(a)}
	PCR (g/dl) (n=20) (vr $\leq$ 1,00 g/dl)	3,65 (1,70; 6,60)	0,95 (0,30; 1,60)	0,15 (0,00; 0,40)	<0,0001 ^{(2)(b)}
AGA (mg/dl)	M (n=16) (vr: 50-30 mg/dl)	115,40 $\pm$ 46,08	67,44 $\pm$ 26,69	62,18 $\pm$ 21,35	<0,0001 ^{(1)(c)}
	F (vr: 40-120 mg/dl)	127,80 $\pm$ 92,78 (n=5)	66,20 $\pm$ 53,60 (n=5)	43,98 $\pm$ 7,57 (n=4)	0,278 ⁽³⁾
VHS (mm/h)	M (n=11) (vr $\leq$ 10mm/h)	37,64 $\pm$ 28,61	18,32 $\pm$ 13,38	10,59 $\pm$ 7,41	0,0016 ^{(1)(d)}
	F (vr $\leq$ 20mm/h)	65,00 $\pm$ 31,23 (n=5)	20,00 $\pm$ 12,98 (n=5)	19,33 $\pm$ 13,65 (n=4)	0,025 ⁽³⁾

PT: proteínas totais; Alb: albumina; Glob: globulinas; PCR: proteína C-reativa; AGA: alfa-1 glicoproteína ácida; VHS: velocidade de hemossedimentação; vr: valor de referência.

Metodologia utilizada:

(1) ANOVA pareada ($\alpha = 0,05$). Resumo em média e desvio – padrão.

(2) Friedman ($\alpha = 0,05$). Resumo em mediana e quartís.

(3) t de Student pareado ($\alpha = 0,05$). Comparação entre momentos 1 e 2. Resumo em média e desvio – padrão.

(a) mom1 > mom2; mom1>mom3 ($\alpha = 0,05$ – Teste de Bonferroni)

(b) mom 1 > mom2 > mom3 ($\alpha = 0,05$ – Teste de Dunn)

(c) mom1 > mom2; mom1>mom3 ($\alpha = 0,05$ – Teste de Bonferroni)

(d) mom1 > mom2; mom1>mom3 ($\alpha = 0,05$ – Teste de Bonferroni)

Em relação às citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , estas foram determinadas em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos em um único momento no grupo controle (G1) e nos doentes com tuberculose pulmonar (G2) antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose, sem ou com estímulo com PHA (IFN- γ) e LPS (TNF- α , IL-10 e TGF- β). Assim, antes do tratamento (M1), e sem estímulo, níveis de TNF- α , apresentados como média e desvio padrão, em G2 (472,75 pg/ml $\pm$ 164,13) foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (125,45 pg/ml $\pm$ 33,04). O mesmo ocorreu com o IFN- γ , maior em G2 (560,21 pg/ml $\pm$ 210,98) do que em G1 (247,35 pg/ml $\pm$ 56,31), com significância estatística ($p \leq 0,001$). Também os níveis de IL-10 foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) em G2 (60,21 pg/ml $\pm$ 22,15) do que em G1 sem estímulo (9,40 pg/ml $\pm$ 7,08). Finalmente, observou-se o mesmo com TGF- β , em que níveis em G2 (628,89 pg/ml $\pm$ 172,75) foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (176,30 pg/ml $\pm$ 54,73) (Tabela 2; Figura 5).

Tabela 2. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, sem estímulo, entre os grupos G1 e G2 antes do tratamento (M1).

Citocinas (pg/ml)	G1 (n=20)	G2 (n=28)	p
TNF-α	125,45 $\pm$ 33,04	472,75 $\pm$ 164,13*	<0,001 ⁽¹⁾
IFN-γ	247,35 $\pm$ 56,31	560,21 $\pm$ 210,98*	<0,001 ⁽¹⁾
IL-10	9,40 $\pm$ 7,08	60,21 $\pm$ 22,15*	<0,001 ⁽¹⁾
TGF-β	176,30 $\pm$ 54,73	628,89 $\pm$ 172,75*	<0,001 ⁽¹⁾

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar

Metodologia utilizada:

(1) t de Student ($\alpha = 0,05$). Resumo em média e desvio – padrão.

* valores significativos quando $p < 0,05$

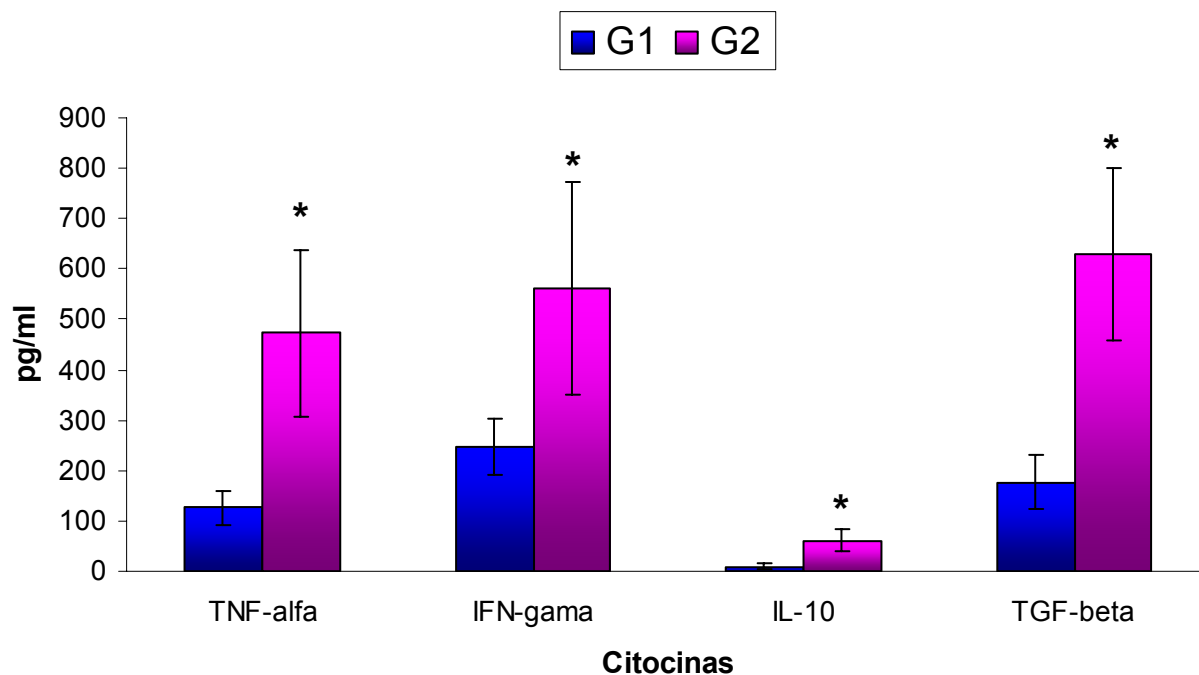


Figura 5. Média e desvio padrão de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, sem estímulo, dos grupos G1 e G2 antes do tratamento M1).

Ainda avaliando os valores das citocinas obtidos em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos antes do tratamento (M1), porém desta vez com a utilização de estímulo, observamos que os níveis de TNF- α , apresentados como média e desvio padrão, em G2 (594,60 pg/ml $\pm$ 184,40) foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (204,20 pg/ml $\pm$ 64,60).

O mesmo ocorreu com o IFN- γ , significativamente maior em G2 (668,14 pg/ml $\pm$ 233,13) do que em G1 (316,30 pg/ml $\pm$ 46,03) ($p \leq 0,001$). Também os níveis de TGF- β em G2 (838,19 pg/ml $\pm$ 163,83) foram significativamente maiores que em G1 (458,45 pg/ml $\pm$ 117,03) ($p \leq 0,001$). Finalmente, observou-se o mesmo para a IL-10, em que os níveis, apresentados como mediana e quartis, foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) em G2 (79,00 pg/ml [65,50; 91,00]) do que em G1 com estímulo (15,00 pg/ml [10,00; 20,50]) (Tabela 3; Figura 6).

Tabela 3. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, com estímulo⁺, entre os grupos G1 e G2 antes do tratamento (M1).

Citocinas (pg/ml)	G1 (n=20)	G2 (n=28)	ρ
TNF-α	204,20 $\pm$ 64,60	594,60 $\pm$ 184,40*	<0,001 ⁽¹⁾
IFN-γ	316,30 $\pm$ 46,03	668,14 $\pm$ 233,13*	<0,001 ⁽¹⁾
IL-10	15,00(10,00; 20,50)	79,00 (65,50; 91,00)*	<0,001 ⁽²⁾
TGF-β	458,45 $\pm$ 117,03	838,19 $\pm$ 163,83*	<0,001 ⁽¹⁾

⁺estímulo: LPS (TNF- α , IL-10 e TGF- β) e PHA (IFN- γ)

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar

Metodologia utilizada:

(1) t de Student ($\alpha = 0,05$) – Teste paramétrico. Resumo em média e desvio – padrão.

(2) Mann - Whitney ($\alpha = 0,05$) – Teste não paramétrico. Resumo em mediana e quartis.

* valores significativos quando $\rho < 0,05$

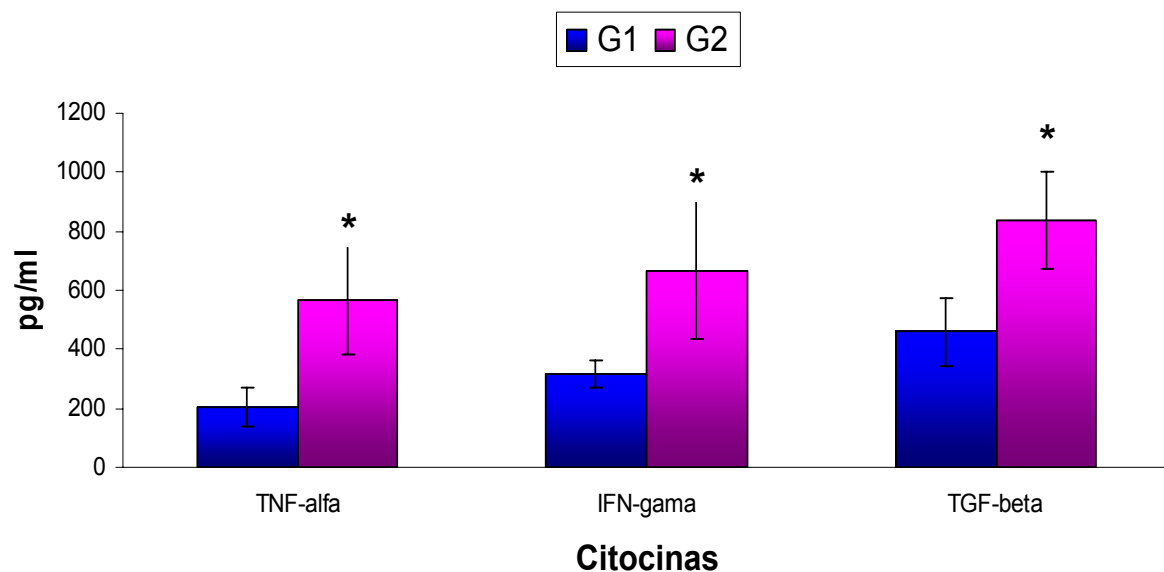


Figura 6. Média e desvio padrão de TNF- α , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 antes do tratamento (M1).

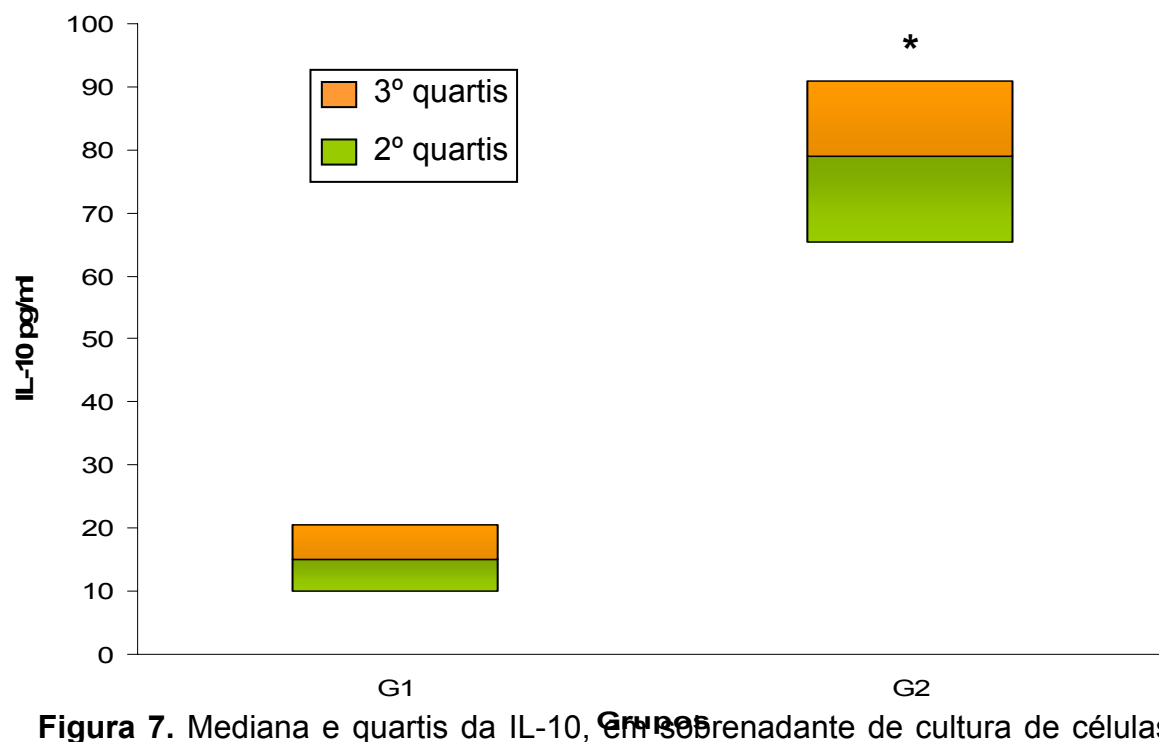


Figura 7. Mediana e quartis da IL-10, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 antes do tratamento (M1).

O estudo das citocinas obtidas em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos aos três meses de tratamento (M2), sem a utilização de estímulo, mostrou níveis de TNF- α , apresentados como média e desvio padrão, em G2 (342,82 $\pm$ 125,25) significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (125,45 pg/ml $\pm$ 33,04). O mesmo ocorreu com a IL-10, maior em G2 (42,18 pg/ml $\pm$ 18,589) do que em G1 (9,40 pg/ml $\pm$ 7,089) ($p \leq 0,001$). Também os níveis de TGF- β em G2 (493,50 pg/ml $\pm$ 167,802) foram significativamente maiores que em G1 (176,30 pg/ml $\pm$ 54,737) ($p \leq 0,001$). Finalmente, observou-se o mesmo para o IFN- γ , em que os níveis, apresentados como mediana e quartis, foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) em G2 (398,82 pg/ml [263,00; 640,00]) do que em G1 sem estímulo (247,00 pg/ml [205,00; 290,00]) (Tabela 4; Figuras 8 e 9).

Tabela 4. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, sem estímulo, entre os grupos G1 e G2 aos três meses de tratamento (M2).

Citocinas (pg/ml)	G1 (n=20)	G2 (n=28)	p
TNF-α	125,45 $\pm$ 33,04	342,82 $\pm$ 125,25*	<0,001 ⁽¹⁾
IFN-γ	247,0 (205,00; 290,00)	398,00(26,00; 640,50)*	<0,001 ⁽²⁾
IL-10	9,40 $\pm$ 7,08	42,18 $\pm$ 18,58*	<0,001 ⁽¹⁾
TGF-β	176,30 $\pm$ 54,73	493,50 $\pm$ 167,80*	<0,001 ⁽¹⁾

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar.

Metodologia utilizada:

(1) t de Student ($\alpha = 0,05$) – Teste paramétrico. Resumo em média e desvio – padrão.

(2) Mann - Whitney ($\alpha = 0,05$) – Teste não paramétrico. Resumo em mediana e quartis.

* valores significativos quando $p < 0,05$

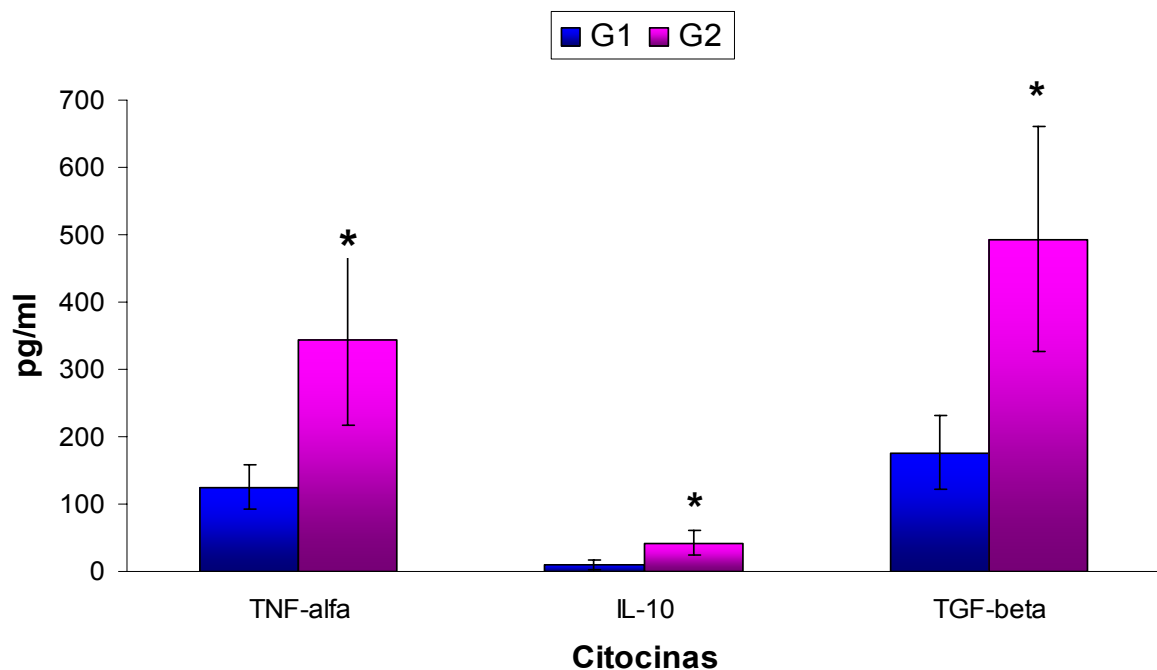


Figura 8. Média e desvio padrão de TNF- α , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, sem estímulo, dos grupos G1 e G2 aos três meses de tratamento (M2).

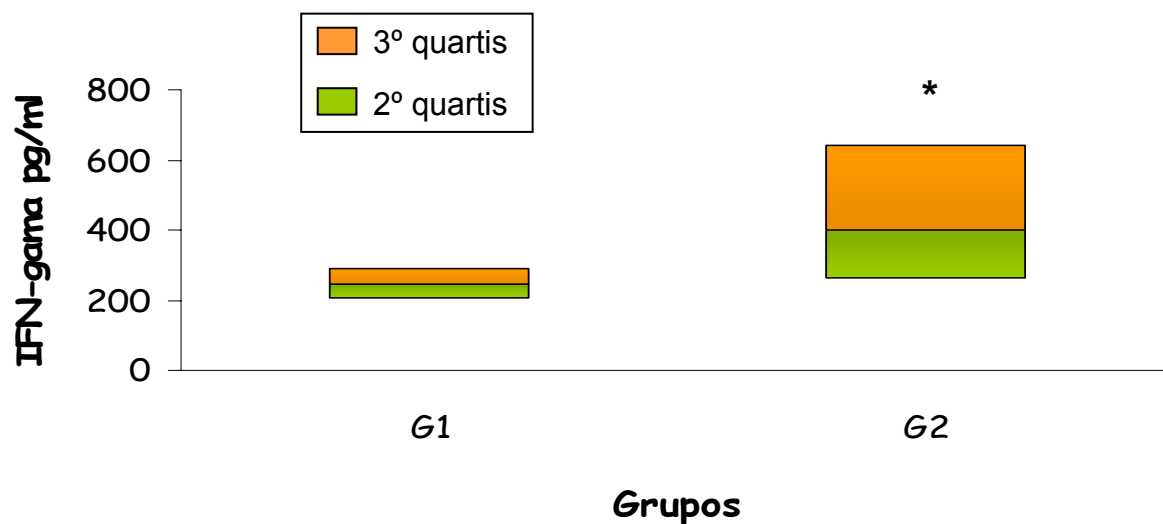


Figura 9. Mediana e quartis do IFN- γ , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, sem estímulo, dos grupos G1 e G2 aos três meses de tratamento (M2).

Em relação aos valores das citocinas obtidos em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos aos três meses de tratamento (M2), porém com a utilização de estímulo, observamos que os níveis apresentados como média e desvio padrão, em G2 (459,00 pg/ml $\pm$ 170,70) foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (204,20 pg/ml $\pm$ 64,60). O mesmo ocorreu com a IL-10, maior em G2 (56,79 pg/ml $\pm$ 21,67) do que em G1 (16,80 pg/ml $\pm$ 9,86) ($p \leq 0,001$). Também os níveis de TGF- β em G2 (674,54 pg/ml $\pm$ 176,32) foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (458,45 pg/ml $\pm$ 117,03). Finalmente, observou-se o mesmo para o IFN- γ , em que os níveis, apresentados como mediana e quartis, foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) em G2 (504,00 pg/ml [323,00; 742,00]) do que em G1 com estímulo (304,00 pg/ml [293,50; 367,50]) (Tabela 5; Figura 10 e 11).

Tabela 5. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, com estímulo⁺, entre os grupos G1 e G2 aos três meses de tratamento (M2).

Citocinas (pg/ml)	G1 (n=20)	G2 (n=28)	ρ
TNF-α	204,2 $\pm$ 64,60	459,00 $\pm$ 170,70*	<0,001 ⁽¹⁾
IFN-γ	304, (293,50; 367,50)	504,00(323,00; 742,00)*	<0,001 ⁽²⁾
IL-10	16,80 $\pm$ 9,86	56,79 $\pm$ 21,68*	<0,001 ⁽¹⁾
TGF-β	458,45 $\pm$ 117,03	674,54 $\pm$ 176,32*	<0,001 ⁽¹⁾

⁺estímulo: LPS (TNF- α , IL-10 e TGF- β) e PHA (IFN- γ)

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar.

Metodologia utilizada:

(1) t de Student ($\alpha = 0,05$) – Teste paramétrico. Resumo em média e desvio – padrão.

(2) Mann - Whitney ($\alpha = 0,05$) – Teste não paramétrico. Resumo em mediana e quartis.

* valores significativos quando $p < 0,05$

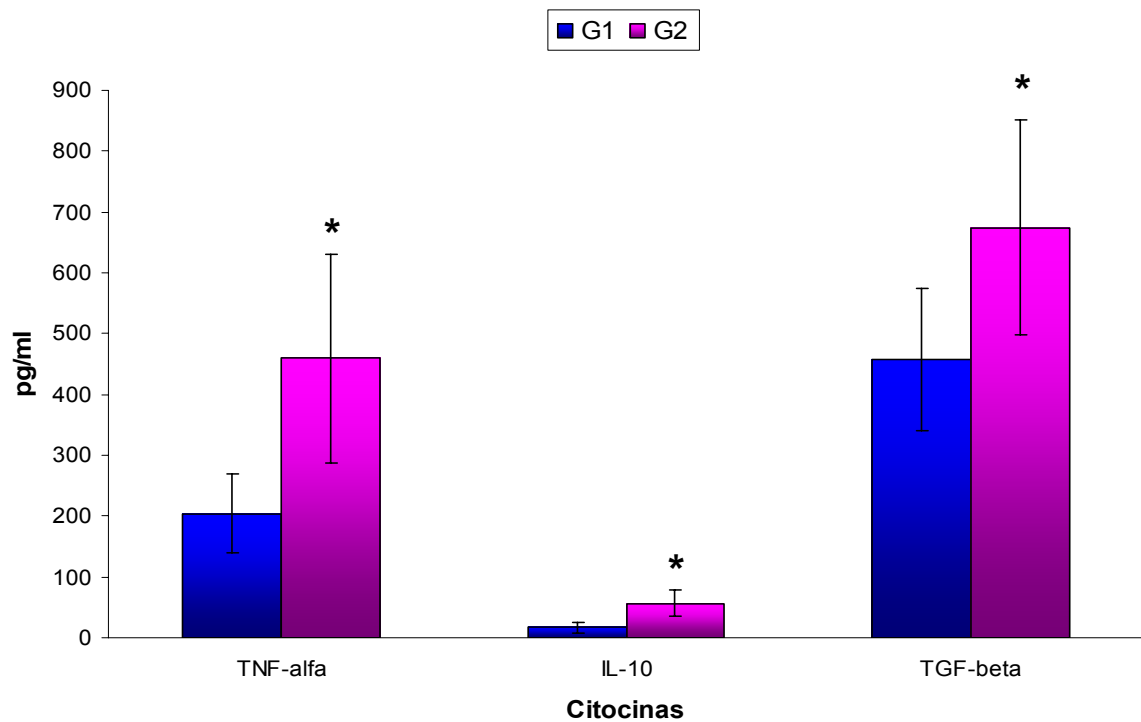


Figura 10. Média e desvio padrão de TNF- α , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 aos três meses de tratamento (M2).

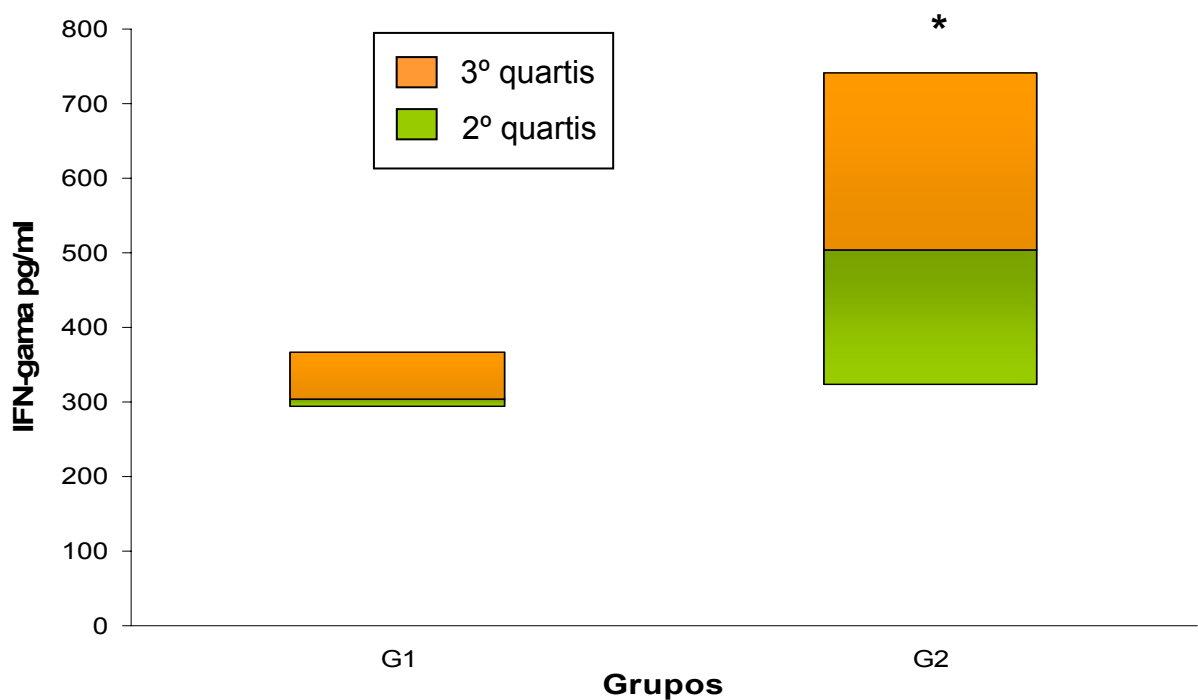


Figura 11. Mediana e quartis do IFN- γ , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 aos três meses de tratamento (M2).

Avaliando os níveis das citocinas obtidos em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos ao final do tratamento (M3), sem a utilização de estímulo, observamos que os níveis de TNF- α , apresentados como média e desvio padrão, em G2 (219,29 pg/ml $\pm$ 130,07) foram significativamente maiores ($p=0,001$) que em G1 (125,45 pg/ml $\pm$ 33,04). O mesmo ocorreu com a IL-10, maior em G2 (27,52 pg/ml $\pm$ 18,48) do que em G1 (9,40 pg/ml $\pm$ 7,08) ($p\leq 0,001$). O mesmo foi observado para o TGF- β , cujos níveis, apresentados como mediana e quartis, foram significativamente maiores ($p\leq 0,001$) em G2 (291,0 pg/ml [225,0; 389,0]) do que em G1 sem estímulo (182,00 pg/ml [132,00; 222,50]). Não houve diferença significativa entre os níveis de IFN- γ encontrados em G2 (216,00 pg/ml [195,00; 381,00]) e G1 (247,00 pg/ml [205,00; 290,00]) ($p>0,05$) (Tabela 6; Figuras 12 e 13).

Tabela 6. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, sem estímulo, entre os grupos G1 e G2 ao final do tratamento (M3).

Citocinas (pg/ml)	G1 (n=20)	G2 (n=21)	p
TNF- α	125,45 $\pm$ 33,04	219,29 $\pm$ 130,07*	0,001 ⁽¹⁾
IFN- γ	247,00 (205,00; 290,00)	216,00 (195,00; 381,00)	0,794 ⁽²⁾
IL-10	9,40 $\pm$ 7,08	27,52 $\pm$ 18,48*	<0,001 ⁽¹⁾
TGF- β	182,00 (132,00; 222,05)	291,0 (225,00; 389,00)*	<0,001 ⁽²⁾

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar.

Metodologia utilizada:

(1) t de Student ($\alpha = 0,05$) – Teste paramétrico. Resumo em média e desvio – padrão.

(2) Mann - Whitney ($\alpha = 0,05$) – Teste não paramétrico. Resumo em mediana e quartis.

* valores significativos quando $p<0,05$

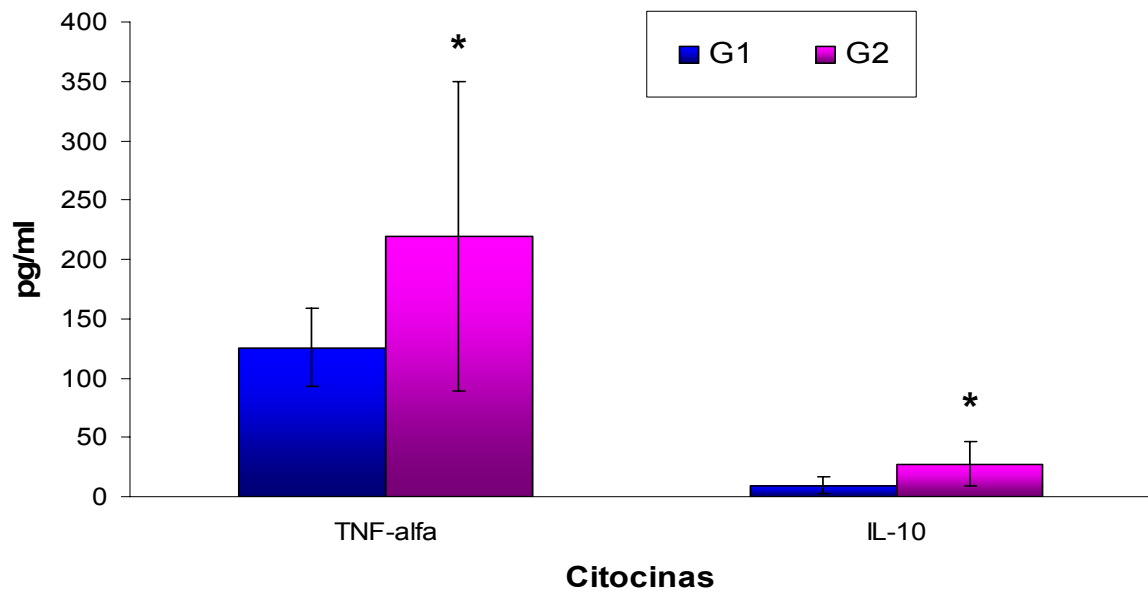


Figura 12. Média e desvio padrão de TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 ao final do tratamento (M3).

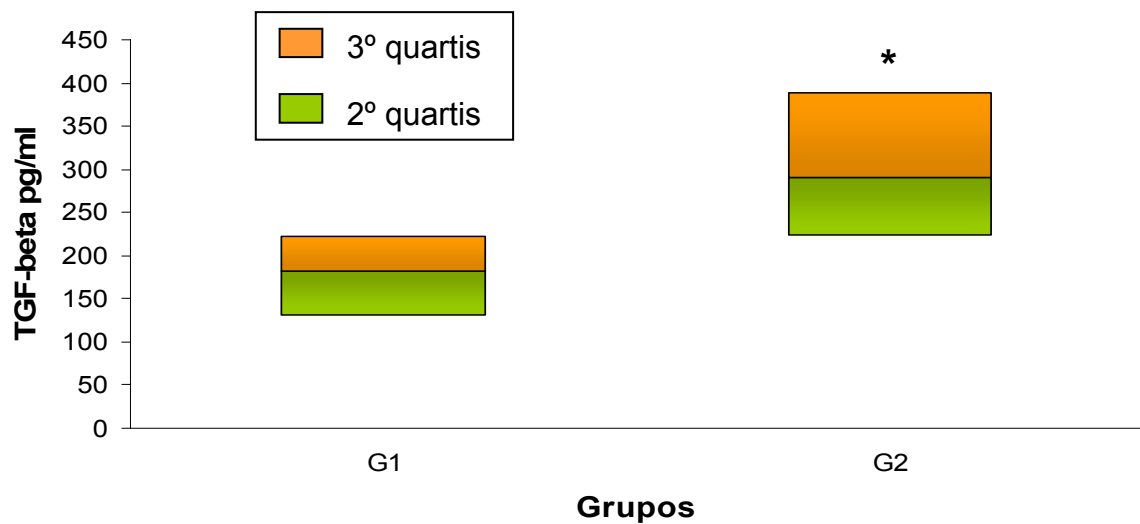


Figura 13. Mediana e quartis do TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, sem estímulo, dos grupos G1 e G2 ao final do tratamento (M3).

Com a utilização de estímulo, em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos, ao final do tratamento (M3), observamos que os níveis de IL-10, apresentados como média e desvio padrão, em G2 (39,80 pg/ml $\pm$ 23,80) foram significativamente maiores ($p \leq 0,001$) que em G1 (16,80 pg/ml $\pm$ 9,86). O mesmo ocorreu para os níveis de TNF- α , apresentados como mediana e quartis, e que estavam também significativamente mais elevados em G2 (281,0 pg/ml [181,5; 499,0]) do que em G1 (205,0 pg/ml [153,5; 243,5]) ($p = 0,028$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os níveis de IFN- γ , apresentados como mediana e quartis, encontrados em G2 (340,00 pg/ml [243,50; 507,50]) e em G1 (304,00 pg/ml [293,50; 367,50]) e de TGF- β encontrados em G2 (440,00 pg/ml [332,00; 527,5]) e em G1 (462,50 pg/ml [389,00; 559,00]) (Tabela 7; Figuras 14 e 15).

Tabela 7. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, com estímulo⁺, entre os grupos G1 e G2 ao final do tratamento (M3).

Citocinas (pg/ml)	G1 (n=20)	G2 (n=21)	p
TNF-α	205,00 (153,50; 243,50)	281,00 (181,50; 499,00)*	0,028 ⁽²⁾
IFN-γ	304,00 (293,50; 367,50)	340,00 (243,50; 507,50)	0,489 ⁽²⁾
IL-10	16,80 $\pm$ 9,860	39,80 $\pm$ 23,80*	<0,001 ⁽¹⁾
TGF-β	462,50 (389,00; 559,00)	440,00 (332,00; 527,50)	0,715 ⁽²⁾

⁺ estímulo: LPS (TNF- α , IL-10 e TGF- β) e PHA (IFN- γ)

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar.

Metodologia utilizada:

(1) t de Student ($\alpha = 0,05$) – Teste paramétrico. Resumo em média e desvio – padrão.

(2) Mann - Whitney ($\alpha = 0,05$) – Teste não paramétrico. Resumo em mediana e quartis.

* valores significativos quando $p < 0,05$

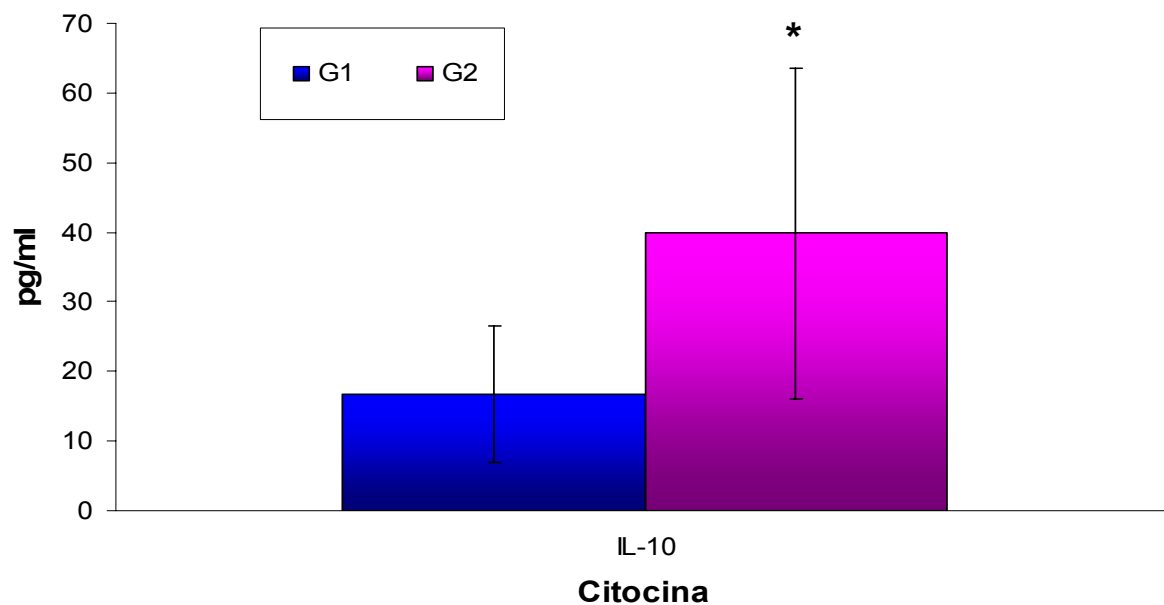


Figura 14. Média e desvio padrão da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 ao final do tratamento (M3).

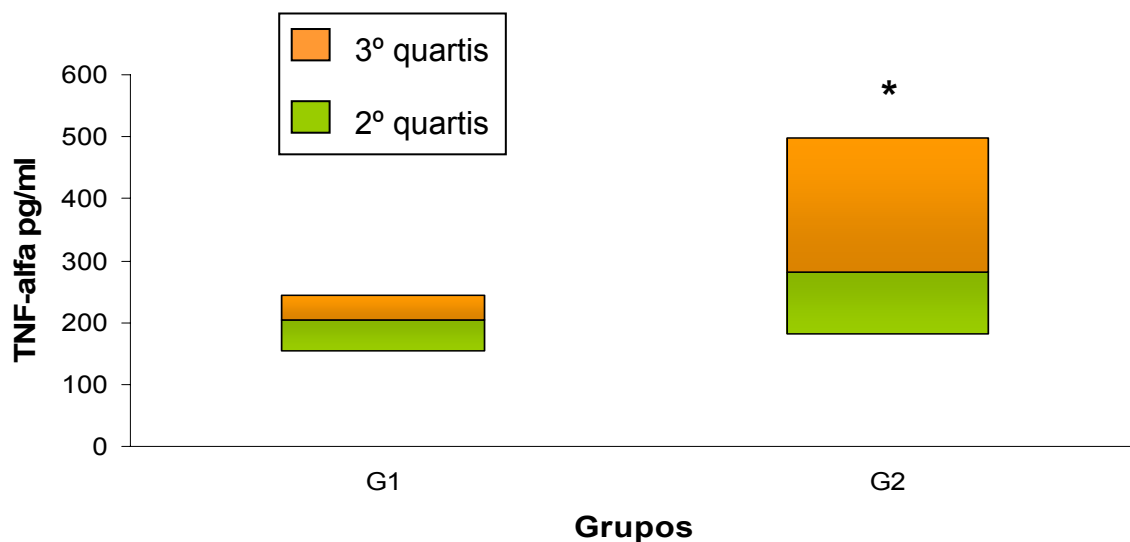


Figura 15. Mediana e quartis do TNF- α , em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, com estímulo, dos grupos G1 e G2 ao final do tratamento (M3).

Realizou-se, ainda, a comparação dos valores das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , apresentados como média e desvio padrão, encontrados no sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos do sangue periférico, sem estímulos, dos doentes com tuberculose pulmonar (G2), antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento antituberculose, sem ou com estímulo com PHA (IFN- γ) e LPS (TNF- α , IL-10 e TGF- β). Assim, sem a utilização de estímulos, os níveis, de TNF- α em M1 (485,3 pg/ml $\pm$ 167,8) foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que em M2 (343,3 pg/ml $\pm$ 138,0) e que em M3 (219,3 pg/ml $\pm$ 113,1). Os valores de TNF- α encontrados em M2 também foram significativamente maiores do que em M3 ($p < 0,01$). O mesmo ocorreu com o IFN- γ , pois os níveis encontrados em M1 (532,2 pg/ml $\pm$ 202,2) estavam significativamente mais elevados do que em M2 (440 $\pm$ 216,3) ($p < 0,01$) e do que em M3 (295,6 pg/ml $\pm$ 147,2) ($p < 0,001$). Os valores de IFN- γ encontrados em M2 também foram significativamente mais elevados ($p < 0,001$) do que os em M3. Para a IL-10, sem estímulo, os níveis encontrados em M1 (60,33 pg/ml $\pm$ 147,20) foram significativamente maiores ($p < 0,001$) do que em M2 (42,57 pg/ml $\pm$ 21,21) e em M3 (27,52 pg/ml $\pm$ 18,48) ($p < 0,001$). Os níveis de IL-10 em M2 também foram significativamente maiores que os de M3 ($p < 0,001$). Finalmente, foi observado o mesmo comportamento para os níveis do TGF- β , que em M1 (636,60 pg/ml $\pm$ 191,40) se encontravam significativamente maiores ($p < 0,001$) do que em M2 (492,0 pg/ml $\pm$ 185,10) e M3 (318,30 pg/ml $\pm$ 135,70). Os níveis de TGF- β também foram significativamente mais elevados em M2 do que em M3 ($p < 0,001$) (Tabela 8; Figura 16).

Tabela 8. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β de G2, em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, sem estímulo, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Citocinas (pg/ml)	M1	M2	M3	$p^{(*)}$
TNF-α (n=21)	485,30 $\pm$ 16,80	343,30 $\pm$ 138,00	219,3 $\pm$ 113,10	<0,0001 ⁽¹⁾
IFN-γ (n=21)	532,20; 202,20	440,00 $\pm$ 216,30	295,60 $\pm$ 147,20	<0,0001 ⁽²⁾
IL-10 (n=21)	60,33 $\pm$ 23,11	42,57 $\pm$ 21,21	27,52 $\pm$ 18,48	<0,0001 ⁽³⁾
TGF-β (n=21)	636,60 $\pm$ 191,40	492,50 $\pm$ 185,10	318,30 $\pm$ 135,70	<0,0001 ⁽⁴⁾

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar.

Metodologia utilizada:

(*) ANOVA para amostras dependentes ($\alpha = 0,05$)

(1) M1>M2 ($p<0,001$); M1>M3 ($P<0,001$); M2>M3 ($P<0,01$)

(2) M1>M2 ($p<0,01$); M1>M3 ($p<0,001$); M2>M3 ($p<0,001$)

(3) M1>M2 ($p<0,001$); M1>M3 ($p<0,001$); M2>M3 ($p<0,001$)

(4) M1>M2 ($p<0,001$); M1>M3 ($p<0,001$); M2>M3 ($p<0,001$)

(Teste de Bonferroni ao nível de significância $\alpha = 0,05$)

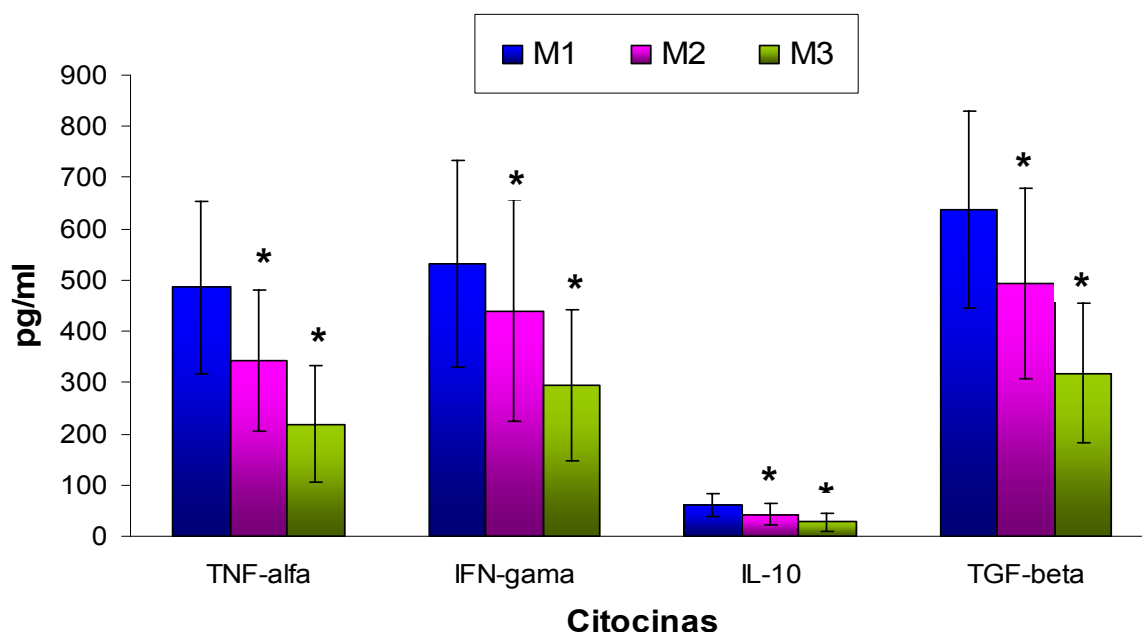


Figura 16. Média e desvio padrão de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β de G2, em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, sem estímulo, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Os valores das mesmas citocinas, obtidas em sobrenadante de cultura de células totais e de monócitos, foram avaliados após a utilização de estímulos, verificando-se que os níveis de TNF- α , em M1 (601,90 pg/ml $\pm$ 193,10) foram significativamente maiores que em M2 (472,40 pg/ml $\pm$ 190,10) ($p < 0,01$) e que em M3 (321,40 pg/ml $\pm$ 158,90) ($p < 0,001$). Em M2, os valores de TNF- α encontrados também foram significativamente maiores do que em M3 ($p < 0,01$). O mesmo ocorreu com o IFN- γ , em que os níveis encontrados em M1 (646,70 pg/ml $\pm$ 222,80) estavam significativamente mais elevados ($p < 0,001$) do que em M2 (523,80 pg/ml $\pm$ 229,70) e do que em M3 (392,60 pg/ml $\pm$ 191,10). Os valores de IFN- γ encontrados em M2 também foram significativamente mais elevados ($p < 0,001$) do que os em M3. Os níveis de IL-10 após estímulo, encontrados em M1 (81,05 pg/ml $\pm$ 24,58) foram significativamente maiores ($p < 0,001$) do que em M2 (56,81 pg/ml $\pm$ 24,58) e em

M3 (39,86 pg/ml $\pm$ 23,82) ($p < 0,001$). Por sua vez, os níveis de IL-10 em M2 foram significativamente maiores que os de M1 ($p < 0,001$). Finalmente, foi observado o mesmo comportamento para os níveis do TGF- β , que em M1 (837,50 pg/ml $\pm$ 180,90) se encontravam significativamente maiores ($p < 0,001$) do que em M2 (676,80 $\pm$ 175,10) e M3 (476,10 pg/ml $\pm$ 200,00). Os níveis de TGF- β também foram significativamente mais elevados em M2 do que em M3 ($p < 0,001$) (Tabela 9; Figura 17).

Tabela 9. Comparação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β de G2, em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, com estímulo⁺, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Citocinas (pg/ml)	M1	M2	M3	$p^{(*)}$
TNF-α (n=21)	601,90 $\pm$ 193,10	472,40 $\pm$ 190,10	321,40 $\pm$ 158,90	<0,0001 ⁽¹⁾
IFN-γ (n=21)	646,70 $\pm$ 222,80	523,80 $\pm$ 229,70	392,60 $\pm$ 191,10	<0,0001 ⁽²⁾
IL-10 (n=21)	81,05 $\pm$ 24,58	56,81 $\pm$ 24,58	39,86 $\pm$ 23,82	<0,0001 ⁽³⁾
TGF-β (n=20)	837,5 $\pm$ 180,9	676,8 $\pm$ 175,1	476,1 $\pm$ 200	<0,0001 ⁽⁴⁾

⁺estímulo: LPS (TNF- α , IL-10 e TGF- β) e PHA (IFN- γ)

G1: grupo normal; G2: grupo de doentes com tuberculose pulmonar.

Metodologia utilizada:

(*) ANOVA para amostras dependentes ($\alpha = 0,05$)

(1) M1>M2 ($p < 0,01$); M1>M3 ($p < 0,001$); M2>M3 ($p < 0,01$)

(2) M1>M2 ($p < 0,001$); M1>M3 ($p < 0,001$); M2>M3 ($p < 0,001$)

(3) M1>M2 ($p < 0,001$); M1>M3 ($p < 0,001$); M2>M3 ($p < 0,001$)

(4) M1>M2 ($p < 0,001$); M1>M3 ($p < 0,001$); M2>M3 ($p < 0,001$)

(Teste de Bonferroni ao nível de significância $\alpha = 0,05$)

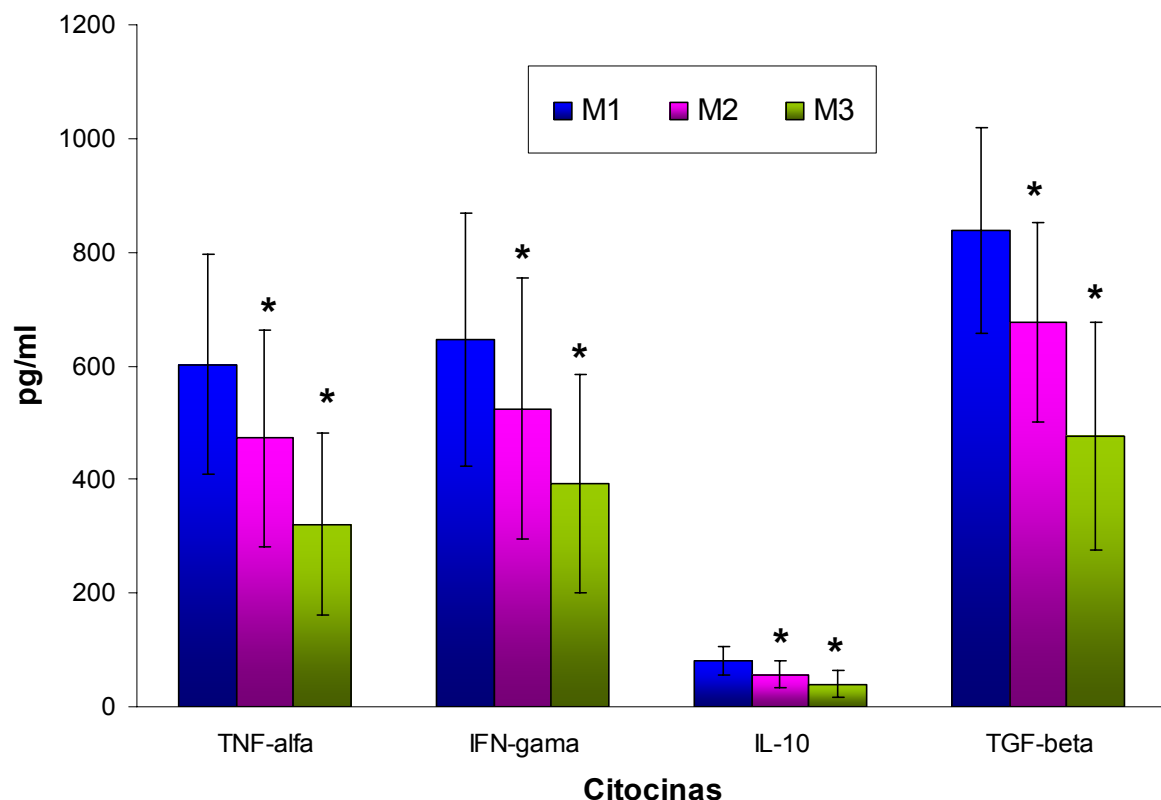


Figura 17. Média e desvio padrão de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β de G2, em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico, com estímulo, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

A correlação realizada entre os valores séricos das globulinas e do PCR com os das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas totais e monócitos dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), sem a utilização de estímulos, nos três momentos (M1, M2 e M3), é apresentada pela Tabela 10. Assim, em M1, foi observada correlação negativa entre globulinas e todas as citocinas realizadas, sendo que houve significância estatística ($p \leq 0,05$) apenas na correlação com IFN- γ e IL-10. Em M2, houve correlação negativa entre as globulinas e todas as citocinas

determinadas, porém, sem significância ($p \geq 0,05$). Finalmente, em M3 foi observada correlação positiva entre globulinas e $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TGF-}\beta$ e negativa com IL-10, tudo isso sem significância ($p \geq 0,05$). Quanto à PCR, em M1 houve correlação negativa com o $\text{TNF-}\alpha$ e positiva com as demais citocinas, porém em nenhum caso com significância ($p \geq 0,05$). Em M2, houve correlação positiva não significativa entre a PCR e todas as citocinas determinadas ($p \geq 0,05$). Finalmente, em M3 foi observada correlação positiva entre a PCR e todas as citocinas determinadas, também tudo sem significância ($p \geq 0,05$).

Tabela 10. Correlação entre valores de globulinas e proteína C reativa séricas e de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 e $\text{TGF-}\beta$, em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico de G2, sem estimulação, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Citocina (pg/ml)	Glob ^(a) (g/dl)			PCR ^(a) (g/dl)		
	M1 (n=28)	M2 (n=28)	M3 (n=21)	M1 (n=27)	M2 (n=28)	M3 (n=21)
TNF-α	-0,303	-0,017	0,289	-0,094	0,112	0,051
IFN-γ	-0,425 *	-0,321	0,050	0,061	0,194	0,226
IL10	-0,408 *	-0,289	-0,061	0,096	0,313	0,014
TGF-β	-0,176	-0,045	0,365	0,111	0,297	0,257

G2: pacientes com tuberculose pulmonar; Glob: globulina; PCR: proteína reativa C

Metodologia utilizada:

(a) Correlação de Spearman

* valores significativos quando $p < 0,05$

Em G2, nos indivíduos do sexo feminino, a correlação realizada entre os valores séricos do VHS e da $\alpha 1$ -glicoproteína ácida com os das citocinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 e $\text{TGF-}\beta$ de sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas totais e de monócitos, sem a utilização de estímulos, nos três momentos (M1, M2 e M3), é apresentada na Tabela 11. Assim, em M1, houve

correlação positiva do VHS com TNF- α , IFN- γ e IL-10 e negativa com o TGF- β , mas sem significância ($p \geq 0,05$). Em M2, houve correlação negativa do VHS com TNF- α e positiva com as demais citocinas avaliadas, também sem significância ($p \geq 0,05$). Em M3, houve correlação negativa entre VHS e todas as citocinas realizadas, sendo que houve significância estatística ($p \leq 0,05$) apenas na correlação com IFN- γ e IL-10. Quanto à $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, em M1 houve uma correlação negativa com o IFN- γ e positiva com as demais citocinas, tudo isso sem significância ($p \geq 0,05$). Em M2, houve correlação positiva da $\alpha 1$ -glicoproteína ácida com TNF- α e negativa com as demais citocinas determinadas, sem significância ($p \geq 0,05$). Finalmente, em M3 foi observada correlação positiva entre $\alpha 1$ -glicoproteína ácida com o TNF- α e o TGF- β e negativa entre com IFN- γ e IL-10, também sem significância ($p \geq 0,05$).

Tabela 11. Correlação entre valores da velocidade de hemossedimentação e $\alpha 1$ -glicoproteína ácida séricos e de ao TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , avaliados nos indivíduos do sexo feminino de G2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico sem estimulação, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Citocina (pg/ml)	VHS ^(a) (mm/h)			AGA (mg/dl)		
	M1 (n=5)	M2 (n=5)	M 3 (n=3)	M1 ^(b) (n=5)	M2 ^(b) (n=5)	M3 ^(a) (n=4)
TNF-α	0,100	0,500	-0,500	0,200	0,500	0,200
IFN-γ	0,600	-0,100	-1,000 *	-0,300	-0,100	-0,316
IL-10	0,410	-0,308	-1,000 *	0,718	-0,300	-0,258
TGF-β	-0,718	-0,100	-0,500	0,051	-0,100	0,200

G2: pacientes com tuberculose pulmonar; VHS: velocidade de hemossedimentação; AGA: $\alpha 1$ -glicoproteína ácida

Metodologia utilizada:

(a) Correlação de Spearman

(b) Correlação de Pearson

* valores significativos quando $p < 0,05$

A correlação realizada nos indivíduos do sexo masculino de G2, entre os valores séricos do VHS e da α 1-glicoproteína ácida séricos com os das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas totais e de monócitos, sem a utilização de estímulos, nos três momentos (M1, M2 e M3), é apresentada pela Tabela 12. Assim, em M1, houve correlação positiva não significativa do VHS com TNF- α e TGF- β e negativa com as demais citocinas avaliadas ($p \geq 0,05$). Em M2, houve correlação negativa do VHS com TNF- α , IFN- γ e TGF- β e positiva com IL-10, sem significância ($p \geq 0,05$). Em M3, houve correlação negativa entre VHS e TGF- β e positiva com todas as demais citocinas realizadas, tudo sem significância ($p \geq 0,05$). Quanto à α 1-glicoproteína ácida, em M1 houve uma correlação positiva com TNF- α e TGF- β e negativa com o IFN- γ e IL-10, tudo sem significância ($p \geq 0,05$). Em M2, houve correlação negativa da α 1-glicoproteína ácida com TNF- α e TGF- β e positiva com IFN- γ e IL-10, tudo isso sem significância ($p \geq 0,05$). Finalmente, em M3 foi observada correlação positiva entre α 1-glicoproteína ácida com IL-10 e negativa com as demais citocinas determinadas, também tudo sem significância ($p \geq 0,05$).

Tabela 12. Correlação entre valores da velocidade de hemossedimentação e α 1-glicoproteína ácida séricos e de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , avaliados nos indivíduos do sexo masculino de G2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e de monócitos do sangue periférico sem estimulação, antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3) do tratamento.

Citocina (pg/ml)	VHS ^(a) (mm/h)			AGA (mg/dl)		
	M1 (n=22)	M2 (n=18)	M3 (n=15)	M1 ^(b) (n=22)	M2 ^(b) (n=23)	M3 ^(a) (n=17)
TNF-α	0,151	-0,337	-0,004	0,016	-0,086	-0,056
IFN-γ	-0,056	-0,389	-0,206	-0,020	0,143	-0,148
IL10	-0,089	0,056	-0,058	-0,012	0,190	0,198
TGF-β	-0,227	-0,322	0,081	0,023	-0,045	-0,054

G2: pacientes com tuberculose pulmonar; VHS: velocidade de hemossedimentação; AGA: α 1-glicoproteína ácida

Metodologia utilizada:

(a) Correlação de Spearman

(b) Correlação de Pearson

* valores significativos quando $p < 0,05$



V - Discussão

A tuberculose ainda permanece como um dos principais problemas de saúde em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, apesar dos esforços para se obter melhor diagnóstico e tratamento da doença. ⁽¹¹⁸⁾ Em sua forma pulmonar, a tuberculose causa por ano, no mundo, cerca de três milhões de óbitos, superando a mortalidade pela aids, malária, diarreia, hanseníase e outras doenças tropicais somadas. ⁽¹¹⁹⁾ No Brasil, cerca de seis mil mortes são reportadas todo ano. ⁽¹²⁰⁾

Diversos estudos mostram a maior prevalência da tuberculose entre indivíduos do sexo masculino. ^(121,122) Na presente casuística, esse achado também foi observado. Essa maior ocorrência entre os homens pode ser devida, entre outras causas, a diferenças biológicas entre os gêneros, como resposta imune; diferenças epidemiológicas entre homens e mulheres, como exposição ao *M. tuberculosis*, ligadas às atividades profissionais e diferenças nos hábitos, como o de fumar. ⁽¹²³⁾ A média de idade encontrada nos pacientes deste estudo também foi semelhante à relatada por outros autores, em trabalhos realizados no Brasil. ^(121,122)

Entre os obstáculos que dificultam o controle da doença citam-se o tratamento de longa duração e a falta de marcadores que indiquem o sucesso ou falha da terapêutica específica. ⁽¹¹⁸⁾ A cultura de escarro, realizada após oito semanas de tratamento, tem sido utilizada como uma referência de resposta às drogas antituberculose. Entretanto, este método não é ideal para o acompanhamento da resposta ao tratamento em tempo real, pois a espera exigida até que o resultado seja conhecido, por volta de seis semanas, é muito longa. Então, o encontro de marcadores que indiquem a efetividade do tratamento na contenção do processo inflamatório é essencial, uma vez que a cura muitas vezes é baseada somente nos aspectos clínicos, radiológicos e em um diagnóstico bacteriológico negativo, realizado em escarro emitido espontaneamente ou em lavado bronco-alveolar. ⁽¹²⁴⁾

Ribeiro-Rodrigues et al. ⁽¹¹⁸⁾ realizaram estudo interessante, cujos resultados sugerem que as citocinas produzidas no pulmão podem ser utilizadas como marcadores de evolução para cura. No estudo, esses autores demonstram que, ao longo do tratamento, é possível verificar diminuição dos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-8 produzidas no foco da infecção por meio da avaliação destas citocinas no escarro, em amostras coletadas antes e após

duas, quatro, oito e 12 semanas de tratamento. Como essas citocinas têm uma estreita relação com o desaparecimento da micobactéria, podendo, até, precedê-lo, os autores sugerem sua utilização como marcadores de atividade da doença e do processo de inflamação, assim como para a avaliação da resposta a novos tratamentos antituberculose. Embora no estudo ora em discussão não se tenham determinado os níveis dessas substâncias pró-inflamatórias no local da lesão, os resultados obtidos com a dosagem das citocinas produzidas por células mononucleares do sangue periférico também mostraram diminuição dos seus valores ao longo do tratamento.

A importância das citocinas na patogenia da tuberculose é incontestável, pois, não só são responsáveis pela interação do linfócito T com o macrófago infectado, fator central da imunidade protetora contra o *M. tuberculosis*, como também são produzidas durante essa interação.⁽⁴⁸⁾ Agindo sobre o fígado, as citocinas pró-inflamatórias induzem a produção de PFA, substâncias que têm papel fundamental no processo inflamatório tuberculoso.⁽¹²⁵⁾ Na forma pulmonar da doença, a ação das citocinas inflamatórias ativa uma forte RFA, local e sistêmica, como resultado de um complexo de respostas homeostáticas e fisiológicas por elas induzidas.^(91,126) Diversos estudos têm demonstrado essa forte RFA, pela elevação de PFA em pacientes com tuberculose pulmonar.⁽¹²⁷⁻¹³¹⁾ Além de promover aumento ou diminuição dos níveis plasmáticos dessas proteínas, as citocinas são responsáveis pelos sintomas encontrados na doença em atividade, como, febre, leucocitose e mudanças neuro-endócrinas.^(121,122)

Na tuberculose, a RFA pode ser caracterizada por uma elevação na concentração plasmática da PCR.⁽¹³²⁾ É provável que os valores circulantes dessa proteína, na infecção pela micobactéria, representem o melhor reflexo do processo inflamatório e do dano tecidual, com atuação acima da de outros parâmetros, também de fase aguda, como a viscosidade plasmática e o VHS.⁽¹⁰⁶⁾ Em relação ao VHS, Oliva et al. (informação pessoal) estudando pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital das Clínicas de Botucatu, verificaram valores deste marcador de fase aguda significativamente mais elevados do que os normais. Outros autores sugerem que a normalização do VHS pode ser um marcador de boa resposta ao tratamento de doenças subagudas e crônicas, como a tuberculose.^(133,134)

Além de marcadores de atividade, as PFAs também têm sido estudadas como avaliadoras do efeito do tratamento específico na tuberculose pulmonar. Immanuel et al., ⁽¹³⁵⁾ observando pacientes antes, durante, ao final do tratamento e aos doze meses pós-tratamento específico, demonstraram diminuição na concentração de PCR, ceruloplasmina, haptoglobina e AGA.

Outro trabalho, que avaliou esses doentes no momento do diagnóstico e após um, dois e quatro meses de tratamento específico, mostrou elevação significativa de IgG, IgM, α -1 antitripsina (AAT) e haptoglobina nas quantificações iniciais, ao passo que os níveis de transferrina e α 2-macroglobulina apresentaram diminuição significativa. Não foram observadas mudanças nos níveis de albumina, IgA e fator C3 do complemento. Todas essas proteínas estudadas tiveram seus níveis diminuídos no decorrer da terapia, mas, aos quatro meses de tratamento, os níveis de IgG e AAT ainda se encontravam significativamente mais elevados que os normais, enquanto que o nível de haptoglobina teve uma queda importante, atingindo valores até abaixo do padrão de normalidade. ⁽¹³⁶⁾

Suzuki et al., ⁽¹³⁷⁾ estudando a efetividade do tratamento da tuberculose pulmonar, determinou os níveis séricos de PCR, AGA, haptoglobina, AAT e ácido siálico, correlacionando-os com outros indicadores bioquímicos, como imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM) e VHS em doentes. Os autores verificaram que os níveis de AGA, haptoglobina, AAT e ácido siálico estavam significativamente mais elevados na fase pré-tratamento do que os de indivíduos normais e foram diminuindo até a normalidade, três a cinco semanas após a negatização da cultura para o bacilo da tuberculose, enquanto que a PCR, as imunoglobulinas e o VHS demonstraram tendência para níveis mais baixos do que os dos controles normais. Os autores, então, sugerem a utilização de AGA, haptoglobina, AAT e do ácido siálico como indicadores bioquímicos sensíveis de prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento antituberculose.

Também Plit et al., ⁽¹³⁸⁾ avaliando pacientes com tuberculose pulmonar, verificaram queda significativa nos níveis plasmáticos pré-tratamento de PCR e ferritina, quando comparados aos obtidos ao final de seis meses de terapia específica.

Outro estudo de pacientes com tuberculose pulmonar em atividade constatou, antes da introdução do tratamento, valores de VHS, PCR, glóbulos brancos totais e de granulócitos significativamente mais elevados do que os de indivíduos normais. Após os seis meses de tratamento, tanto os níveis de PCR, como os dos parâmetros hematológicos, encontravam-se normais. ⁽¹³⁹⁾

Os resultados do presente estudo estão, em geral, condizentes com os da literatura, pois os doentes com tuberculose pulmonar apresentaram aumento significativo de globulinas, AGA, PCR e VHS antes do tratamento em relação aos níveis encontrados após três e seis meses de terapia. Os resultados permitem sugerir, assim como o fizeram outros autores, a utilização desses parâmetros para avaliar o efeito do tratamento específico em doentes com a forma pulmonar da doença. Como estes marcadores mostraram, no momento inicial, aumento significativo dos níveis na maioria dos pacientes, em relação aos normais, talvez também possam ser utilizados para auxiliar o diagnóstico presuntivo da doença em indivíduos com baciloscopia negativa, mas com epidemiologia e exames de imagem sugestivos da doença, o que torna mais segura a indicação do teste terapêutico.

O aumento de PFA na tuberculose está intimamente relacionado com a resposta imune envolvida na formação do processo inflamatório granulomatoso. Na resposta imune do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*, a formação do granuloma é uma das múltiplas funções das citocinas, juntamente com o desenvolvimento da hipersensibilidade tardia. ^(140,141) Sharma et al. ⁽¹⁴²⁾ demonstraram uma elevada produção de IL-12, TNF- α e óxido nítrico (NO) por monócitos do sangue periférico de pacientes com infecção pelo *M. tuberculosis*, ou por monócitos estimulados com componentes micobacterianos, demonstrando que as células são imunocompetentes.

Na fase inicial da infecção tuberculosa, com o predomínio da imunidade celular de perfil Th1, protetor, há produção elevada das citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , estimulantes da RFA. ⁽¹⁴³⁻¹⁴⁷⁾ Em estádios evolutivos mais avançados, como o da doença em atividade, predomina a imunidade do tipo Th2, com produção de IL-4 e IL-10, citocinas antiinflamatórias, supressoras da resposta Th1. ^(148,149) Quando a resposta Th2 é excessiva, há estímulo para desenvolvimento de fibrose. ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾ O tratamento efetivo recupera a resposta Th1, com subsequente contensão do bacilo.

Pelo seu papel destacado na fisiopatologia do processo inflamatório, induzido pelo *M. tuberculosis*, vários autores têm demonstrado a importância das citocinas como marcadores de atividade da tuberculose ou de resposta ao tratamento específico. ⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾

Olobo et al. ⁽¹⁵³⁾ encontraram níveis de TNF- α elevados no fluido pleural dos doentes com pleurite tuberculosa e até no plasma de contactantes saudáveis de pacientes com tuberculose pulmonar. Na doença recém-diagnosticada, monócitos de pacientes, estimulados com LPS ou BCG, apresentaram produção aumentada de TNF- α , em comparação com os de casos crônicos. ⁽¹⁵⁴⁾ Este dado igualmente é encontrado no soro dos doentes após o início do tratamento. ⁽¹⁵⁴⁾ Outro estudo demonstrou elevada produção de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico de pacientes estimuladas com antígeno do *M. tuberculosis*, quando comparada ao controle. ⁽¹⁵⁵⁾ Este e outros estudos sugerem que o TNF- α é necessário no estágio inicial para limitar a multiplicação da micobactéria, sendo sua rápida produção essencial para o controle da tuberculose no hospedeiro. ⁽¹⁵⁴⁾ No presente estudo, a produção de TNF- α pelos monócitos do sangue periférico dos pacientes, com ou sem estímulo com LPS, também foi significativamente mais elevada, antes do início, aos três meses e ao final do tratamento, quando comparada à do grupo controle.

No trabalho de Moura et al., ⁽¹²⁴⁾ células mononucleares do sangue periférico de um grupo de pacientes com tuberculose pulmonar em atividade, estimuladas com BCG, produziam níveis elevados de TNF- α , que não diferiram dos níveis de outro grupo de pacientes que já haviam concluído o tratamento, o que mostra seu papel, além de na imunopatogenia, também na proteção. Em outro estudo, pacientes com tuberculose tinham os níveis séricos de TNF- α , antes do tratamento, significativamente mais elevados do que os de indivíduos normais e com tuberculose inativada pelo tratamento. ⁽¹⁵⁶⁾ Deveci et al. ⁽¹⁵⁶⁾ observaram que os níveis de TNF- α iam diminuindo significativamente após dois, quatro e seis meses de tratamento, nos pacientes com tuberculose pulmonar em atividade. Os resultados do presente estudo também mostraram diminuição significativa nos níveis de TNF- α em relação ao momento do diagnóstico, aos três meses e ao final do tratamento antituberculose.

Sahiratmadja et al. ⁽¹³⁹⁾ encontraram níveis de TNF- α significativamente mais elevados, em sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas, estimuladas com *M. tuberculosis* ou LPS, de doentes com tuberculose pulmonar antes do tratamento, quando comparados aos controles normais. Esses níveis foram menores após dois meses de terapia específica, atingindo valores próximos aos do controle, ao final do tratamento (seis meses). Além disso, observaram que a produção de TNF- α , induzida pelo LPS, foi significativamente maior se comparada à induzida pelo sonicato de *M. tuberculosis*. Estes resultados, muito semelhantes aos obtidos nesta pesquisa, e que estão de acordo com a maioria dos autores que estudaram a atuação do TNF- α no processo tuberculoso, permitem que se sugira a utilização desta citocina como marcador de atividade inflamatória e de resposta ao tratamento, no atendimento de doentes com tuberculose pulmonar.

Quanto ao IFN- γ , outra importante citocina para a formação do granuloma, Shams et al. ⁽¹⁵⁷⁾ demonstraram que pacientes com tuberculose pulmonar avançada, no início do tratamento, têm proporção reduzida de células TCD4⁺ e TCD8⁺ que produzem esta substância e também redução na produção do IFN- γ em resposta ao *M. tuberculosis*, quando comparadas a indivíduos saudáveis reatores ao teste da tuberculina. ⁽¹⁵⁷⁾ Esta inibição de células produtoras de IFN- γ parece ser antígeno-específica, e não por incapacidade generalizada de produção pelos grupos. Isto porque em cultura de células, tanto de doentes, quanto de indivíduos saudáveis não reatores à tuberculina, após estímulo com PHA, a frequência de células produtoras de IFN- γ não difere. Shams et al. ⁽¹⁵⁷⁾ ainda mostraram que, embora a quantidade de IFN- γ produzida pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺ seja igualmente importante, as primeiras são essenciais para que as TCD8⁺ produzam IFN- γ , já que a depleção de TCD4⁺ antes da estimulação com *M. tuberculosis* aboliu completamente a produção da citocina.

Em outro estudo, células mononucleares periféricas de pacientes com tuberculose, estimuladas com *M. tuberculosis*, apresentaram produção reduzida e expressão de mRNA diminuída das citocinas IFN- γ e IL-2, quando comparadas com indivíduos saudáveis que haviam reagido ao teste da tuberculina. ⁽¹⁵⁸⁾ Trabalho conduzido por Sahiratmadja et al. ⁽¹³⁹⁾ encontrou

valores mais baixos de IFN- γ do que os do controle antes, com aumento dos níveis ao longo do tratamento, chegando a valores próximos dos produzidos pelo grupo controle, quando as células foram estimuladas com o sonicado de *M. tuberculosis*, sendo o estímulo dose-dependente. Desta forma, estes e outros autores sugerem que ocorre uma forte imunorregulação e temporária imunossupressão antígeno-específica durante a tuberculose ativa. ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶⁴⁾ Existem evidências de que a resposta seja menor no compartimento periférico, devido ao encaminhamento das células reativas para o foco da lesão em atividade. ⁽¹⁶⁵⁾

Todos esses resultados, de produção diminuída de IFN- γ em tuberculosos, diferem do obtido no presente estudo, no qual foi encontrada uma elevada produção desta citocina por células mononucleares totais do sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar antes do tratamento. Esta discordância pode ser devida à intensidade do processo inflamatório da tuberculose nos doentes avaliados nas pesquisas. Enquanto que no presente estudo os pacientes apresentavam a forma moderada da doença, o trabalho de Shams et al ⁽¹⁵⁷⁾ avaliou pacientes com tuberculose em estádios moderadamente ou muito avançados, e verificou que os pacientes com a doença muito avançada tinham os menores índices de células produtoras de IFN- γ , indicando que a produção da citocina por células TCD4⁺ e TCD8⁺ correlaciona-se às manifestações clínicas da doença.

Já Lai et al., ⁽¹⁶⁶⁾ avaliando a expressão gênica de células mononucleares periféricas de pacientes com tuberculose pulmonar moderada, antes do tratamento, estimuladas com PHA e *phorbol myristate acetate*, mostraram expressão da IL-2 aumentada, de Interleucina-15 (IL-15) diminuída e a de IL-4 e IFN- γ similar à dos controles normais.

O estímulo não específico (PHA) demonstrou capacidade significativamente reduzida em produzir IFN- γ pelas células mononucleares totais de pacientes com tuberculose, quando comparada à do grupo controle, sem aumento da produção desta citocina durante o tratamento. ⁽¹³⁹⁾ As diferenças entre esses resultados e os do presente estudo talvez se expliquem pelas diferentes técnicas de cultura empregadas e pelo tipo de tuberculose pulmonar que os pacientes apresentavam. Enquanto no trabalho de

Sahiratmadja et al. ⁽¹³⁹⁾ a cultura de células mononucleares periféricas totais foi incubada por seis dias e foram avaliados pacientes tanto com a doença moderada, quanto avançada, no presente estudo o sobrenadante das culturas de células mononucleares periféricas totais, obtidas de pacientes com a forma moderada, foi colhido após 24 horas de incubação, sem ou com estímulo da PHA, esta última em concentração diferente daquela utilizada por Sahiratmadja et al. ⁽¹³⁹⁾

Concordando com os resultados apresentados neste estudo, outros autores demonstraram que os níveis de IFN- γ se encontram elevados em células mononucleares totais do sangue periférico, estimuladas com antígeno de *M. tuberculosis*. ⁽¹⁵⁵⁾ O estudo realizado por Verbon et al. ⁽¹⁶⁷⁾ avaliou amostras de soro de três grupos de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar: antes do tratamento; com tratamento parcial; com tratamento completo e de dois grupos controles: contactantes saudáveis e indivíduos normais. No trabalho de Verbon et al., ⁽¹⁶⁷⁾ foi demonstrado que os níveis séricos de IFN- γ estavam significativamente mais elevados nos pacientes com a doença em atividade antes da terapia, quando comparados com os outros grupos de pacientes e controles. Pacientes após o tratamento, assim como os contactantes, tiveram níveis de IFN- γ iguais aos do controle normal.

A diminuição da produção de IFN- γ ao longo do tratamento ainda foi demonstrada por Bektas et al. ⁽¹⁶⁸⁾ por dosagens séricas pelo método de ELISA, em pacientes com tuberculose pulmonar, antes e dois meses após o início do tratamento: os níveis finais foram significativamente menores que os iniciais.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os pacientes com tuberculose pulmonar apresentavam produção de IFN- γ por células mononucleares periféricas totais significativamente maior que a do grupo controle, antes e aos três meses de tratamento, com e sem estímulo pela PHA. No entanto, esses níveis iam diminuindo, de maneira significativa, ao longo do tratamento.

Finalmente, vários autores, como Moura et al. ⁽¹²⁴⁾ observaram produção significativamente elevada de IFN- γ , antes e após o tratamento antituberculose em células mononucleares do sangue periférico de pacientes, submetidas a

diversos estímulos antigênicos.^(124,169,170) Este aumento final nos níveis do IFN- γ , que diverge dos resultados da presente casuística, pode ser consequência da utilização de diferentes técnicas de cultura celular. Segundo os diversos autores, ainda, este aumento pode ser induzido por antígenos liberados após a morte da micobactéria pelo tratamento, por uma reversão do *status* do antígeno ou pela redução do trânsito de linfócitos T específicos para o pulmão. Alguns autores têm demonstrado que existe uma relação entre a produção de certas citocinas por células mononucleares do sangue periférico e a gravidade da doença.^(124,169,170) Dlugovitzky et al.⁽¹⁷¹⁾ observaram que pacientes com evolução clínica moderada apresentavam níveis significativamente mais elevados de IFN- γ , do que pacientes com a doença mais avançada. Na casuística do presente estudo, no entanto, os doentes apresentavam tuberculose de moderada intensidade.

A IL-10, considerada uma citocina antiinflamatória, atua na desativação dos macrófagos pela inibição da produção de IL-12 e conseqüente redução na produção de IFN- γ pelos linfócitos T. A atividade da IL-10 minimiza o dano que ocorre no foco da doença, pois inibe a produção de citocinas inflamatórias. De fato, em pacientes com tuberculose, foram encontrados níveis elevados de IL-10.⁽¹⁶⁵⁾

Níveis de IL-10 estão elevados não só em pacientes com tuberculose pulmonar, mas também em seus contactantes saudáveis.⁽¹⁵³⁾ A citocina está presente em níveis elevados inclusive no fluido pleural dos pacientes com pleurite tuberculosa.⁽¹⁵³⁾ Durante a fase de grande atividade do processo inflamatório, antes do tratamento, a IL-10 é produzida em quantidades significativamente maiores do que durante ou mesmo após a terapêutica específica. Mas, durante o tratamento, os níveis da citocina ainda estão maiores do que os de indivíduos normais.⁽¹⁶⁷⁾ No entanto, em indivíduos saudáveis, mas reatores à tuberculina, não foi detectada diferença nos níveis das citocinas do tipo TH2, como a IL-10, quando comparados com tuberculosos.⁽¹⁵⁸⁾ Novamente, as divergências entre os resultados existem em função da metodologia utilizada pelos autores, das condições clínicas dos pacientes estudados, da variação no tempo de evolução da doença ou de tratamento, entre outras. Às vezes, não há informação quanto ao momento da

doença em que é determinada: enquanto Verbon et al. ⁽¹⁶⁷⁾ verificaram níveis séricos em grupos de pacientes em diversos momentos de terapia, no estudo de Zang et al. ⁽¹⁵⁸⁾ estas informações não são conhecidas.

No estudo realizado por Moura et al. ⁽¹²⁴⁾ foi demonstrado que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar produziram elevados níveis de IL-10. Neste estudo, a cinética da citocina, parece não ter sofrido influência do tratamento. Como também foram encontrados níveis constantes e altos de TNF- α , os autores sugerem que a produção de IL-10 nos pacientes se mantenha constante na tentativa de compensar o dano tissular causado por aquela citocina.

No presente estudo também foi demonstrado aumento significativo da produção de IL-10 por monócitos do sangue periférico dos pacientes com tuberculose pulmonar, antes, durante e ao final do tratamento antituberculose, com e sem estímulo com LPS, em relação aos valores obtidos no grupo controle. Embora tenha havido diminuição na produção desta citocina ao longo do tratamento, no final, seus níveis ainda permaneciam significativamente mais elevados do que os produzidos pelo grupo controle.

Os resultados de Deveci et al. ⁽¹⁵⁶⁾ são semelhantes aos do presente estudo, pois encontraram níveis de IL-10 significativamente elevados nos pacientes, em relação aos dos grupos controles, níveis estes que sofreram diminuição significativa ao longo dos meses de tratamento. No estudo de Sahiratmadja et al. ⁽¹³⁹⁾ o aumento de produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose em atividade foi pequeno, porém significativo, após estímulo com LPS. Diferente do observado nos resultados apresentados neste estudo, porém, os valores ao final da terapia eram equivalentes aos encontrados no grupo controle.

Pacientes com tuberculose possuem níveis elevados de TGF- β e estudos *in vitro*, utilizando células linfóides, têm demonstrado que esta citocina está relacionada com a progressão da tuberculose pulmonar. ^(153,164,165) Produtos micobacterianos induzem a produção em excesso de TGF- β na tuberculose por monócitos e células dendríticas, com maior expressão no foco da infecção, podendo atuar como uma citocina antiinflamatória ou promover dano tecidual e fibrose, estes últimos freqüentemente encontrados no foco da

lesão granulomatosa. ^(60,143,153,167,172,173) Vários estudos demonstram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose produzem mais TGF- β do que de indivíduos controles. ^(171,174) Além dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, também os contactantes, assim como pacientes tratados e curados de tuberculose pulmonar, têm níveis plasmáticos elevados de TGF- β . Em pacientes com comprometimento pleural tuberculoso, a citocina está presente, em níveis elevados, também no líquido pleural. ⁽¹⁵³⁾ O presente estudo está de acordo com a literatura apresentada, pois foram encontrados níveis significativamente mais elevados nos doentes, com ou sem a utilização de LPS, antes e aos três meses de tratamento, e ao final deste, durante produção espontânea. Os níveis de TGF- β diminuíram significativamente ao longo do tratamento desses doentes.

Deveci et al., ⁽¹⁵⁶⁾ estudando o comportamento de células mononucleares do sangue periférico na tuberculose, não encontraram diferença nos níveis séricos de TGF- β dos doentes, quando comparados aos dos grupos controles. Como também não encontraram efeito relevante do tratamento sobre os níveis desta citocina, sugeriram que o TGF- β 1 tem efeito pró-inflamatório em concentrações baixas e antiinflamatório, em altas. As diferenças encontradas no comportamento de TGF- β na tuberculose, pelos diversos autores que estudaram este tema, com base na estimulação *in vitro* de células, podem ser atribuídas às técnicas de isolamento e de cultura utilizadas, nem sempre as mesmas. ⁽¹⁵⁶⁾

Os resultados apresentados neste estudo, de maneira geral, não demonstraram nenhuma correlação importante entre os marcadores de RFA e as citocinas. Entretanto, em um estudo realizado com modelo experimental de tuberculose pulmonar, em camundongos, no qual a infecção com *M. tuberculosis* foi considerada aguda até o 28º dia, os autores obtiveram dois picos na produção de AGA e de fibrinogênio, no 1º e 21º dias após infecção e associaram este aumento às citocinas inflamatórias. O primeiro pico ocorreu devido à RFA normal do fígado, que parece estar relacionada ao efeito rápido e sinérgico de algumas citocinas, como IL-1 α , TNF- α e IL-6, demonstrando a importância do sistema de resposta aguda para promover a proteção no início da infecção. O segundo pico foi relacionado com a máxima produção de IL-6

observada, maturidade total dos granulomas, máxima RFA e também a uma potencialização do efeito de IL-1 α , TNF- α e IL-6 por meio do sinergismo com os glicocorticóides. ⁽¹²⁵⁾

No presente estudo foi observada uma diminuição de alguns dos marcadores da RFA, que se encontravam elevados antes do tratamento, ao longo da terapia e este comportamento também foi observado para as citocinas avaliadas. Por este motivo, esperava-se uma correlação significativa importante entre os parâmetros avaliados, já que as citocinas são os principais indutores da RFA. ⁽¹²⁵⁾ Essa correlação esperada, no entanto, não foi encontrada, talvez devido ao tamanho amostral ou à heterogeneidade da população avaliada. Novos estudos são necessários, com casuística maior, para que se compreenda melhor o mecanismo da relação entre a RFA e as citocinas.

Quanto às citocinas, foi demonstrado neste trabalho um aumento significativo de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β antes e aos três meses de tratamento, com e sem a utilização de estímulos, e de TNF- α e de IL-10 com e sem estímulo, assim como de TGF- β endógeno, aos seis meses, quando comparados ao grupo controle. Também foi notado que os níveis de todas as citocinas estudadas, com ou sem estímulo, encontram-se significativamente maiores antes, havendo uma diminuição em sua produção ao longo da terapia antituberculose. Desta forma, os pacientes com tuberculose pulmonar, avaliados antes do tratamento, apresentavam um perfil do tipo Th0, com a produção de citocinas que caracterizam o perfil Th1 (IFN- γ) e o Th2 (IL-10) e também a produção de citocina do tipo regulatória e indutora de fibrose (TGF- β). Ao final do tratamento, estes pacientes haviam evoluído para um perfil Th2, provavelmente para diminuir os efeitos nocivos da atividade pró-inflamatória do perfil Th1. A produção acima dos níveis normais de TNF- α pode ser explicada porque, além de induzir inflamação, nesta fase do processo, esta citocina também está envolvida na ativação dos fibroblastos, para o processo reparador de fibrose. ⁽⁵⁶⁾ A presença de níveis ainda alterados de TGF- β se justifica, por ser esta citocina de extrema importância no processo de deposição da matriz extracelular e de fibrose, característicos da contensão do processo inflamatório e da cicatrização na tuberculose. ⁽¹⁷⁵⁾

VI - Conclusão



1 - O encontro de valores significativamente acima dos níveis de referência dos marcadores de fase aguda globulinas, AGA, PCR e VHS, antes do início do tratamento antituberculose, sugere sua utilidade para o diagnóstico presuntivo da tuberculose e, juntamente com o histórico clínico-epidemiológico do paciente, para que se indique o teste terapêutico em indivíduos com baciloscopia negativa.

2 - A PCR se mostrou o melhor dos marcadores de fase aguda para acompanhar a resposta ao tratamento, pois seus valores diminuíram significativamente até a normalização, após seis meses de tratamento.

3 - O IFN- γ foi a citocina pró-inflamatória que melhor expressou a involução do processo tuberculoso, apresentando declínio constante ao longo da terapia específica, até a normalização ao final do tratamento, o que sugere sua utilidade para o acompanhamento de doentes com tuberculose pulmonar.



VII - Referências Bibliográficas[☆]

* As referências bibliográficas foram formatadas segundo as normas Vancouver, disponibilizadas na List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine, atualizado em outubro de 2004, no endereço eletrônico:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/journals/loftext.noprov.html>.

1. Raja A. Immunology of tuberculosis. Indian J Med Res. 2004; 120: 213-32.
2. Lapa e Silva JR, Boéchat N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. J Bras Pneumol. 2004; 30(4): 478-84.
3. World Health Organization Publications. [http://www.who.int/en/ WHO publications on tuberculosis](http://www.who.int/en/WHO/publications%20on%20tuberculosis). Tuberculosis facts – handout 2007. Available from: <http://www.who.int/tb/en>
4. Small PM, Fujiwara PL. Management of tuberculosis in the United States. N Engl J Med. 2001; 345: 189-200.
5. Brasil. Ministério da Saúde. <http://www.saude.gov.br> Plano Nacional de Controle da Tuberculose/ Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 1.999. 184p. [cited 2001 Jun 02]. Available from: <http://www.saude.gov.br/programas/Tuberculose/abertura.html>.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de referência “Professor Hélio Fraga”. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2^a ed. Rio de Janeiro;1994.
7. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Rev Saúde Pública. 1999; 3 (3): 281-6.
8. Mello LCQ. Modelos preditivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar aucibacilar [Tese], Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da UFRJ; 2001.
9. Ager EM, Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. Vaccine. 2002; 21 (1-2): 7-114.

10. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 2003; 5:159-67.
11. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum.* 2002; 61Suppl 2: 1154-58.
12. Iseman MD, Madsen LA. Drug resistant tuberculosis. *Clin Chest Med.* 1989; 338:1641-9.
13. Ferraz FC, Melo FBS, Albuquerque MFPM, Montenegro SML, Abath FGC. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39:1387-97.
14. World Health Organization. <http://www.who.int/en> Geneva: WHO; 2006
Available from:
http://www.who.int/entity/tb/publications/global_report/2006/pdf/bra.pdf
15. Edwards D, Kirkpatrick C. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134:1062-71.
16. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol.* 2001; 19: 93-129.
17. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 679-91.
18. Lawn SD, Shattock RJ, Acheampong JW, Lal RB, Folks TM, Griffin GE, et al. Sustained plasma TNF- α , and HIV-1 load despite resolution of others parameters of immune activation during treatment of tuberculosis in Africans. *AIDS.* 1999; 13: 2231-7.
19. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol.* 1990; 12: 721-7.

20. Flynn JL, Goldstein MM, Cahn J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995; 2: 561-72.
21. Hernandez-Pando R, Rook GAW. The role of TNF alpha in T-cell inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology*. 1994; 82: 591-5.
22. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumber A, Modlin RL. Local Production of tumor necrosis factor and IFN- γ in tuberculosis picuritis. *J Immunol*. 1990; 145: 149-54.
23. Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I, Kishimoto S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 1990; 58: 3286-92.
24. Jacobs M, Brown N, Allie N, Gulert R, Ryffel B. Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. *Immunology*. 2000; 100:26-33.
25. Ota T, Okubo Y, Sekiguchi M. Analysis of immunologic mechanisms of high natural killer cell activity in tuberculous pleural effusions. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142: 29-33.
26. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavolon L, Velaquillo C, Larriva-Sahd, et al. Correlation between the kinetics of TH1/TH2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996; 89: 26-33.
27. Madariaga L, Amurrio C, Martin G, Gaarcia-Cebrian F, Biandi J, Lardelli P, et al. Detection of anti-interferon-gamma autoantibodies in subjects

- infected by *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 1998; 2: 62-8.
- 28.** Collins LH, Kaufmann SHE. The many faces of host responses to tuberculosis. [Review Article]. Immunology. 2001; 103:1-9.
- 29.** Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J Exp Med. 1975; 142: 1-16.
- 30.** Russel DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. J Immunol. 1996; 156: 4764-73.
- 31.** MAcGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. J Infect Dis. 1998; 178: 92-100.
- 32.** Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th ed. New York: W.S.Saunders Co.; 2000.
- 33.** Kuby J. Immunology. 4^h ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
- 34.** Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunologia. 4th ed. São Paulo: Manole; 1997.
- 35.** Male D. Immunology: an illustrated outline. 2th ed. St Louis. Sandoz Mosby; 1995.
- 36.** Sousa AO, Lee FK, Freiji R, Lagrange PH, Nahmias A. Human immunodeficiency virus infection alters antigen-induced cytokine

- responses in patients with active mycobacterial diseases. J Infect Dis 1998; 177: 1554-62.
37. Imboden JB. T lymphocytes & Natural Killer cells. In: Stiles DP; Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. 9th ed. Stanford: Appleton & Lange; 1997. p.130-45.
38. Silva CL, Bonato VLD, Lima KM, Coelho-Castelo AA, Faccioli LH, Sartori A, et al. Cytotoxic T cells and mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 2001; 197: 11-8.
39. Liu MA. DNA vaccines: a review. J Intern Med. 2003; 253: 402-10.
40. Munk ME, Gatrill AJ, Kaufmann SH. Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. J Immunol. 1990; 145: 243-9.
41. Ueta C, Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Takashima T, Toba H, Kishijimoto S. Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. Infect Immun. 1994; 62: 5434-41.
42. Tazi A, Bouchonnet F, Valeyre D, Cadranel J, Battesti JP, Hance AJ. Characterization of gamma/delta T- lymphocytes in the peripheral blood of patients with active tuberculosis. A comparison with normal subjects and patients with sarcoidosis. Am Rev Dis. 1992; 146: 1216-21.
43. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science. 1998;282: 121-5.
44. Paul S, Laochumroonvaorapong PS, Kaplan G. Comparable growth of virulent an avirulent *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages *in vitro*. J Intect Dis. 1996; 174: 105-12.

45. Zhang M, Gong JH, Lin YG, Barnes PF. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect Immun*. 1998; 66: 794-9.
46. Silver RF, Li Q, Ellner JJ. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes – virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun*. 1998; 66: 190-9.
47. Chensue SW, Warmington K, Ruth JH, Lukacs N, Kunkel SL. Mycobacterial and schistosomal antigen-elicited granuloma formation in IFN-gamma and IL-4 knockout mice – analysis of local and regional cytokine and chemokine networks. *J Immunol*. 1997; 159: 65-73.
48. Munk ME, Emoto M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Resp J*. 1995; 8: S668-75.
49. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander KS, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1998; 19: 513-21.
50. Canetti G. The Tubercle Bacillus in the Pulmonary Lesion of Man: Histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis. New York: Springer Publishing Company Inc; 1995.
51. Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A, Schweyer S, Hens J, Schwartz P, et al. Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J Pathol*. 2000; 191: 417-25.
52. Damjanovi LJ. Anderson's Pathology. Part two: systemic pathology. 10th ed. St. Louis: Mosby Year Book; 1996. p.582-4.

53. Mc Gee JOD, Isaacson PG, Wright NA. Oxford Textbook of Pathology: principles of pathology. Oxford: Oxford University Press; 1992. p.481-3.
54. Stevens A, Lowe J. Pathology. 10th ed. St Louis: Mosby Year Book, 1995. Tissue Response to Damage 5:75-81, Immune, Infective Environmental and nutritional factors in Disease. 1995; 7: 100-2.
55. Mustafa AS, Oftung F. Cytokine production and cytotoxicity mediated by CD4⁺ T cells from health subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis*, BCG, and from pulmonary tuberculosis patients. Nutrition. 1995; 11: 698-701.
56. Robbins SL, Cotran SR, Kumar V. Fundamentos da patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p.84-5.
57. Orme IM. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. Trends Microbiol. 1998; 6: 94-7.
58. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. Infect Immun. 2001; 69: 4195-201.
59. Zahrt TC, Deretic V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antioxid Redox Signal. 2002; 4: 141-59.
60. Van Crevel R, Ottenhoff TMH, van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 294-309.
61. Lasco TM, Cassone L, Kamohara H, Yoshimura T, McMurray DN. Evaluating the role of tumor necrosis factor-alpha in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig. Tuberculosis. 2005; 85: 254-8.
62. Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor-alpha in murine

- mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun.* 2000; 68: 6954-61.
- 63.** Frieland J, Hartley JC, Hartley CG, Shattock RJ, Griffin GE. Inhibition of *ex vivo* proinflammatory cytokine secretion in fatal *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Clin Exp Immunol.* 1995; 100: 233-8.
- 64.** Johnson BJ, McMurray DN. Cytokine gene expression by cultures of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect Immun.* 1994; 62: 1444-50.
- 65.** Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJH, Buurman WA, van Deutekom H, Speelman P, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1328-31.
- 66.** Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of Human CD41 ab T-Cell-Receptor-Positive (TCR1) and gd TCR1 T-Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis* by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor β . *Infect Immun.* 1999; 67: 6461–72.
- 67.** de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells: specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 1993; 150: 4754-65.
- 68.** de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Velde AT, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991; 174: 915-24.

- 69.** Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. *J Immunol.* 1991; 146: 3444-51.
- 70.** Flesch IE, Hess JH, Oswald IP, Kaufmann SH. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN- γ stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor- α and by IL-10. *Int Immunol.* 1994; 6: 693-700.
- 71.** de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10Produced by Monocytes. *J Exp Med.* 1991; 174:1209-20.
- 72.** Chadban SJ, Tesch GH, Foti R, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Immunology.* 1998; 94: 72-8.
- 73.** Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyr R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11: 165-90.
- 74.** Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329: 2002-12.
- 75.** Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of host TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J Immunol.* 1998; 161: 2636-41.
- 76.** Bingisser P, Stey C, Weller M, Groscurth P, Russi E. Apoptosis in human alveolar macrophages is induced by endotoxin and is modulated by cytokines. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1996; 15: 64-70.

77. Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, Lu S, Wang E, Yamamura M, et al. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. J Immunol. 1992; 149: 541-7.
78. Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y, Yoneya I, Soezima K, Ide H. Direct evidence for granulom-inducing activity of interleukin-1. Am J Pathol. 1988; 130: 629-38.
79. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vasalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell. 1989; 56: 731-40.
80. Numerof RP, Aronson FR, Mier JW. IL-2 stimulates the production of IL-1 α and IL-1 β by human peripheral blood nonnuclear cells. J Immun. 1988; 141: 4250-7.
81. Hernandez-Pando R, Orozco H, Honour J, Silva P, Leyva R, Rook GAW. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? FEMS Immunol Med Microbiol. 1995; 12: 63-72.
82. Lezini L, Rottoli P, Rottolo R. The spectrum of human tuberculosis. Clin Exp Immunol. 1977; 27: 230-7.
83. Pinson DM, LeClaire RD, Parmely MJ, Russel R. Regulation by transforming growth factor beta-1 of expression and function of the receptor for IFN gamma on mouse macrophages. J Immunol. 1992; 149: 2028-34.
84. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Assolan RK. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med. 1986; 163: 1037-50.

- 85.** Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta. J Infect Dis. 1994; 170: 1229-37.
- 86.** Tada TH, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, et al. Transforming growth factor beta induced inhibition of T cell function. J Immunol. 1991; 146: 1077-82.
- 87.** Inge TH, McCoy KE, Susskind BM, Barret SK, Zhao G, Bear HD, et al. Immunomodulatory effects of transforming growth factor beta on T lymphocytes. Induction of CD-8 expression in the CTLL-2 cell line and in normal thymocytes. J Immunol. 1992; 148: 3847-56.
- 88.** Maeda Y, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shirahishi A. TGF- β enhances macrophages ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. J Immunol. 1995; 15: 4926-32.
- 89.** Cunha SFC, Cunha DF. Suporte Nutricional. In: Dutra de Oliveira JE, Marchini JS, editors. Ciências nutricionais. São Paulo: Sarvier; 1998. p. 288-303.
- 90.** Santos VM, Cunha SFC, Cunha DF. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. Rev Assoc Med Braz. 2000; 46: 232-6.
- 91.** Shenkin A. Trace elements and inflammatory response implications for nutritional support. Nutrition. 1995; 11: 100-5.
- 92.** Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today. 1994; 15: 74-80.
- 93.** Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunol Today. 1994; 15: 81-8.

- 94.** Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med.* 1990; 7: 147-59.
- 95.** Andus T, Geiger T, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1 β , tumor necrosis factor- α on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur J Immunol.* 1988; 18: 739-46.
- 96.** Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. W B Saunders company. 18th ed. 1991.
- 97.** Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 389: 39-49.
- 98.** Fey GH, Füller GM. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol Biol Med.* 1987; 4: 323-38.
- 99.** Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S, Won K, Jahreis GP. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann. New York Acad. Sci.* 1989; 557: 280-96.
- 100.** Prowse KR, Baumann H. Interleukin-1 and interleukin-6 stimulate acute-phase protein production in primary mouse hepatocytes. *J Leukocyte Biol.* 1989; 45: 55-61.
- 101.** Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB, Ross JA. Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am J Physiol.* 1997; 273: E720-6.
- 102.** Koj A, Guzdek A, Nakamura T, Kordula T. Hepatocyte growth factor and retinoic acid exert opposite effects on synthesis of type 1 and type 2 acute phase proteins in rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995; 27: 39-46.

- 103.** Li X, Sumi T, Matsukawa T, Nakanishi Y, Ohba Y. Thyroid hormone, all-trans retinoic acid, and 9-cis retinoic acid functioned as negative modulators of the effect of glucocorticoids on induction of alpha 1-acid glycoprotein mRNA in RLN-10 cells. *Biochem Mol Biol Int.* 1998; 45: 1-10.
- 104.** Whicher JT, Evans SW. Acute phase proteins. *Hosp Update.* 1990; 16: 899-905.
- 105.** Fisher CL, Gill C, Forrester MG, Nakamura R. Quantification of “acute phase proteins” postoperatively. Value in detection and monitoring of complications. *Am J Clin Pathol.* 1976; 66: 840-6.
- 106.** Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1805-12.
- 107.** Gyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia Médica.* 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
- 108.** Johnson AM, Rohlfes EM, Silverman LM. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p. 477–540.
- 109.** Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth.* 1997;78:201–19.
- 110.** Olshaker JS, Jerard DA. The erythrocyte sedimentation rate. *J Emerg Med.* 1997; 15: 869-74.
- 111.** Fischbach F. *Manual de enfermagem. Exames laboratoriais e diagnósticos.* 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

- 112.** Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 135: 1137–51.
- 113.** Wilkins, EGL. Antibody detection in tuberculosis, p. 81–96. In: Davies PDO, editors. *Clinical tuberculosis*. London: Chapman & Hall Publishing; 1998.
- 114.** Wilkins, EGL, Ivanyi J. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet.* 1990; 336: 641–44.
- 115.** Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de referência “Professor Hélio Fraga”. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2ª ed. Rio de Janeiro; 1994.
- 116.** Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968; 97: 7.
- 117.** Morrison DF. Multivariate statistical methods. New York: McGraw Hill; 1967. p. 336.
- 118.** Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Johnson JL, Ribeiro F, Palaci M, Sá RT, et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 818-23.
- 119.** Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull WHO.* 1992; 70: 149-59.
- 120.** Chaimowicz F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2001; 35: 81-7.
- 121.** Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MAF, Accioly H., Alves MSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia:

- uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. Rev Bras Epidemiol. 2005; 8: 142-9.
- 122.** Santo AH, Pinheiro CE, Jordani MS. Causas múltiplas de morte relacionadas à tuberculose no Estado de São Paulo, 1998. Rev Saúde Pública. 2003; 37: 714-21.
- 123.** Watkins RE, Plant AJ. Does smoking explain sex differences in the global tuberculosis epidemic? Epidemiol. Infect. 2006; 134: 333-9.
- 124.** Moura EP, Toledo VPCP, Oliveira MHO, Spíndola-de-Miranda S, Andrade HM, Guimarães TMPD. Pulmonary tuberculosis: evaluation of interferon- γ levels as an immunological healing marker base on the response to the Bacillus Calmette-Guerin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 283-7.
- 125.** Hernandez-Pando R, Arriaga AK, Panduro CA, Orozco EH, Larriv-Sahd J, Madrid-Marina V. The response of hepatic acute phase response proteins during experimental pulmonary tuberculosis. Exp Mol Pathol. 1998; 65: 15-36.
- 126.** Raviglione MC, O'Brien RJ. Tuberculosis. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KY, editors. Harrison's principles of internal medicine. 14th ed. USA: McGraw-Hill; 1998. p. 1004-14.
- 127.** Johnson JR, Wakefield SL, Turk TL. Serum proteins In pulmonary tuberculosis. Chest. 1967; 52: 732-45.
- 128.** Grange JM, Karkjito T, Setiabudi I. A study of acute-phase reactant proteins in Indonesian patients with pulmonary tuberculosis. Tubercule. 1984; 65: 23-39.

- 129.** de Beer FC, Kirsten GF, Gie RP, Beyers N, Strachan AF. Value of C Reactive protein measurement in tuberculous, bacterial, and viral meningitis. *Arch Dis Child.* 1984; 59: 653-6.
- 130.** Emmett M, Miller JL, Crowle AJ. Protein abnormalities in adult respiratory distress syndrome, tuberculosis, and cystic fibrosis sera. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1987; 184: 74-82.
- 131.** Wong CT, Saha N. Serum immunoglobulin and acute phase protein concentrations in pulmonary tuberculosis patients in Singapore. *Trop Geogr Med.* 1989; 41 (3): 218-21.
- 132.** Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340: 448-54.
- 133.** Sox HC, Liang MH. The erythrocyte sedimentation rate. *Ann Int Med.* 1986; 104: 515-23.
- 134.** Dubost JJ, Soubrier M, Meunie MN, Sauvezie B. De la vitesse de sedimentation au profil inflammatoire. *Rev Med Int.* 1994; 15: 727-33.
- 135.** Immanuel C, Acharyulu GS, Kannaçiran M, Segaran R, Sarma GR. Acute phase proteins in tuberculous patients. *Indian Chest Dis Allied Sci.* 1990; 32: 15-23.
- 136.** Wong CT, Saha N. Changes in serum proteins (albumin, immunoglobulins and acute phase proteins) in pulmonary tuberculosis during therapy. *Tubercle.* 1990; 71: 193-7.
- 137.** Suzuki K, Takashima Y, Yamada T, Akiyama J, Yagi K, Kawashima M, et al. The sequential changes of serum acute phase reactants in response to antituberculous chemotherapy. *Kekkaku.* 1992; 67: 603-11.

- 138.** Plit ML, Theron AJ, Fickl H, van Rensburg CE, Pendel S, Anderson R. Influence of antimicrobial chemotherapy and smoking status on the plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, beta-carotene, acute phase reactants, iron and lipid peroxides in patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 590-6.
- 139.** Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Akmansyah I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun.* 2007; 75: 820-9.
- 140.** Sharma S, Bose M. The role of cytokines in immune response to pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 1995; 63: 736-40.
- 141.** Fleisch IEA, Kaufmann SHE. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology.* 1993; 189: 316-39.
- 142.** Sharma S, Sharma M, Sugata R, Praveen Kumar, Bose M. *Mycobacterium tuberculosis* induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor- α in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis. *Immun Cell Biol.* 2004; 82: 377-82.
- 143.** Dlugovitzky D, Torres-Morales A, Rateni L, Farroni MA, Largacha C, Molteni O, et al. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997; 18: 203-7.
- 144.** Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1987; 138: 293-8.

- 145.** Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 2002; 10: 221-6.
- 146.** Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis.* 2004; 84: 93-101.
- 147.** Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis.* 2005; 85: 53-64.
- 148.** Chan ED, Chan J, Schlger NW. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25: 606-12.
- 149.** Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 8841-8.
- 150.** Davies P, Grange J. The genetics of host resistance and susceptibility to tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 953: 151–6.
- 151.** Remy-Jardin M, Giraud F, Remy J, Watinne L, Wallaert B, Duhamel A. Pulmonary sarcoidosis: role of CT in the evaluation of disease activity and functional impairment and in prognosis assessment. *Radiology.* 1994; 191: 675–80.
- 152.** Miörner H, Gebre N, Karlsson U, Jönsson G, Marcaden R, Wolde A, et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Lancet.* 1994; 344: 127.
- 153.** Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, et al. Circulating TNF- α , TGF- β and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol.* 2001; 53: 85-91.

- 154.** Kart L, Buyukoglan H, Tekin IO, Altin R, Senturk Z, Gulmez I, et al. Correlation of serum tumor necrosis factor- α , interleukin- 4 and soluble interleukin-2 receptor levels with radiologic and clinical manifestations in active pulmonary tuberculosis. *Mediators Inflamm*. 2003, 12: 9-14.
- 155.** Potalez-Peres DP, Baranda L, Layseca E, Fierro NA, de la Fuente H, Rosentein Y, et al. Comparative and prospective study of different immune parameters in healthy subjects at risk for tuberculosis and in tuberculosis patients. *Clin Diagn Lab Immun*. 2002; 9 (2): 299-307.
- 156.** Deveci F, Akbulut HH, Trugut T, Muz MH. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators Inflamm*. 2005; 5: 256-62.
- 157.** Shams H, Wizel B, Weis SE, Samten B, Barnes PF. Contribution of CD8⁺ T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. *Infect Immun*. 2001; 69: 3497-3501.
- 158.** Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995; 63: 3231-4.
- 159.** Ellner, JJ, Hirsch K, Whalen CC. Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: S279–82.
- 160.** Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis*. 1999; 180: 2069–73.
- 161.** Jo EK, Park JK, Dockrell HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16:205–10.

- 162.** Onwubalili JK, Scott GM, Robinson JA. Deficient immune interferon production in tuberculosis. Clin Exp Immunol. 1985; 59:405–13.
- 163.** Subronto YW, van Meijgaarden KE, Geluk A, Arend SM, Sunardi T, Franken KL. Interferon-gamma production in response to M. tuberculosis antigens in TB patients in Indonesia. Adv Exp Med Biol. 2003; 531:249–60.
- 164.** Toossi Z, Ellner JJ. The role of TGF β in the pathogenesis of human tuberculosis. Clin. Immunol. Immunopathol. 1998; 87:107–14.
- 165.** Ellner J. J Immunosuppression in tuberculosis. Infect Agents Dis. 1996; 5:62–72.
- 166.** Lai CKW, Ho S, Chan CHS, Chan J, Choy D, Leung R, et al. Cytokine gene expression profile of circulating CD4⁺ T cells in active pulmonary tuberculosis. Chest. 1997; 111: 606-11.
- 167.** Verbon A, Juffermans N, Vandeventer SJH, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der PT. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. Clin Exp Immunol. 1999; 115: 110-3.
- 168.** Bektas M, Guducuoglu H, Bozkirt H, Onbasi KT, Kurtolgu MG, Andic S. Change in serum concentrations of interleukin-2 and interferon- γ during treatment of tuberculosis. J Intern Med Res. 2004; 32: 324-30.
- 169.** Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sda E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and health household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1998; 66: 176-80.

- 170.** Turner J, Corrah T, Sabbally S, Whittle H, Dockrell HM. A longitudinal study of *in vitro* IFN- γ production in the Gambia. *Tuber Lung Dis.* 2000; 80: 161-9.
- 171.** Dlugovitzky D, Bay ML, Ratani L, Fiorenza G, Vietti L, Farroni A, et al. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immun.* 2000; 122: 343-9.
- 172.** Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immun.* 1995; 154: 465-73.
- 173.** Condos R, Rom WN, Liu YW, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157 (3 pt 1): 729-35.
- 174.** Fiorenza G, Farroni A, Bogue C, Dlugovitzky D. TNF- α , TGF-beta and no relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity. *Immunol Lett.* 2005; 98: 45-8.
- 175.** Fitzpatrick DR, Bielefeldt-Ohmann H. Transforming growth factor β in infectious disease: always there for the host and the pathogen. *Trends Microbiol.* 1999; 7: 140-5.

Resumo



A tuberculose é uma doença ainda em expansão, que foi declarada pela Organização Mundial da Saúde, em 1995, emergência sanitária mundial. Dificultam seu controle a longa duração do tratamento e ausência de marcadores para medir o sucesso ou a falha deste tratamento. Na patogenia da tuberculose, citocinas como IFN- γ e TNF- α têm papel fundamental, pois são responsáveis pela interação do linfócito T com o macrófago infectado, fator central da imunidade protetora contra o *M. tuberculosis*, sendo também produzidas durante essa interação. Como as citocinas pró-inflamatórias têm estreita relação com o desaparecimento da micobactéria, podendo precedê-lo, poderiam ser úteis como marcadores de atividade do processo inflamatório, e da resposta ao tratamento antituberculose. Atuando no fígado, as citocinas pró-inflamatórias induzem uma forte resposta de fase aguda (RFA), local e sistêmica, resultante de um complexo de respostas homeostáticas e fisiológicas por elas induzidas. As proteínas de fase aguda, produzidas pela atividade das citocinas, úteis já na fase de diagnóstico, poderiam também ser utilizadas para monitorizar a resposta ao tratamento, pois podem ser quantificadas de maneira seriada. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de monócitos (MO) e a resposta de fase aguda do soro, por meio das proteínas totais, albumina, globulinas, proteína C-reativa (PCR), α 1-glicoproteína ácida (AGA) e velocidade de hemossedimentação (VHS), como marcadores de regressão da resposta inflamatória ao tratamento antituberculose. Para isso, foram avaliados 20 (G1) doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista, em apenas um momento e 28 (G2) doentes com tuberculose pulmonar: 13 provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e 15 da Secretaria de Estado de Saúde de Bauru. Os pacientes foram avaliados em três momentos em relação ao tratamento: antes (M1), aos três meses (M2) e ao final (M3). As citocinas foram determinadas em 20 ml de sangue periférico, sem ou com a utilização de estímulo: LPS para cultura de monócitos e PHA para a cultura de células mononucleares do sangue periférico, pela técnica de ELISA. Em G2, o comportamento das proteínas de fase aguda, ao

longo do tratamento, foi o seguinte: **Globulinas:** M1>M2, M1>M3 ($p<0,001$); **PCR:** M1>M2>M3, ($p<0,001$); **AGA**, para os homens: M1>M2, M1>M3 ($p<0,001$); **VHS**, para os homens: M1>M2, M1>M3 ($p<0,0016$) e para as mulheres: M1>M2 ($p<0,025$). A comparação entre os níveis de citocinas do sobrenadante de cultura de monócitos e de células mononucleares do sangue periférico, com e sem estímulo, de G1 e de G2 ao longo do tratamento demonstrou: **TNF- α** (com/sem LPS) em M1: G2>G1; em M2: G2>G1 ($p<0,001$); (sem LPS) em M3: G2>G1 ($p<0,001$), (com LPS) em M3: G2>G1 ($p<0,028$); **IFN- γ** (com e sem PHA) em M1: G2>G1; em M2: G2>G1 ($p<0,001$); **IL-10** (com e sem LPS) em M1: G2>G1; em M2: G2>G1; em M3: G2>G1 ($p<0,001$); **TGF- β** (com e sem LPS) em M1: G2>G1; em M2: G2>G1 ($p<0,001$), (sem LPS) em M3: G2>G1 ($p<0,001$). Avaliando somente G2, obtivemos para todas as citocinas do sobrenadante de cultura de monócitos e de células mononucleares do sangue periférico, sem e com estímulo: M1>M2>M3 ($p<0,01$). Como encontramos valores significativamente mais elevados que os valores de referência de globulinas, PCR, AGA e VHS nos pacientes com tuberculose pulmonar antes (M1) do tratamento, estes marcadores poderiam ser utilizados para o diagnóstico presuntivo da tuberculose e, juntamente com o histórico clínico-epidemiológico do paciente, para que se indique o teste terapêutico em indivíduos com baciloscopia negativa. Como os valores da PCR diminuíram ao longo do tratamento, este seria um marcador indicado para o acompanhamento da involução do processo inflamatório e da resposta ao tratamento dos pacientes com tuberculose pulmonar. Assim, quanto às citocinas, foi demonstrado neste trabalho um aumento significativo de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β antes e aos três meses de tratamento, com e sem a utilização de estímulos, e de TNF- α , IL-10 com e sem estímulo e de TGF- β , sem estímulo aos seis meses, quando comparados ao grupo controle. Também foi notado que os níveis de todas as citocinas estudadas, com ou sem estímulo, se encontram significativamente maiores antes, havendo uma diminuição em sua produção ao longo do tratamento antituberculose. Desta forma, os pacientes com tuberculose pulmonar, avaliados antes do tratamento, apresentavam um perfil do tipo Th0, com a produção de citocinas que caracterizam o perfil Th1 (IFN- γ) e o Th2 (IL-10), além da produção de citocina inflamatória TNF- α e

citocina regulatória e indutora de fibrose, TGF- β . Ao final do tratamento, estes pacientes haviam evoluído para o perfil Th2, provavelmente para diminuir os efeitos nocivos da atividade pró-inflamatória do perfil Th1, já que ainda havia produção acima dos níveis normais de TNF- α , indutor de inflamação. A presença de níveis ainda alterados de TGF- β se justifica, por ser esta citocina de extrema importância no processo de deposição da matriz extracelular e de cicatrização, característicos da contenção do processo inflamatório e da cicatrização na tuberculose.

Além disso, como o IFN- γ foi a única citocina que teve os seus níveis normalizados ao final do tratamento antituberculose, este marcador inflamatório seria indicado para acompanhar a involução do processo infeccioso, assim como a eficiência do tratamento.

Abstract



Tuberculosis is still increasing and was declared a worldwide sanitary emergency by the WHO in 1995. Its control is difficult due to long treatment duration and lack of markers of treatment success or failure. Cytokines such as IFN- γ and TNF- α , a central factor in immune response against *M. tuberculosis*, are responsible for the interaction between T lymphocytes and the infected macrophage, and are also produced during this interaction. As proinflammatory cytokines have a close relationship with micobacteria clearance, in fact even preceding it, they could be used as markers for inflammatory activity and response to treatment. Proinflammatory cytokines act in the liver and stimulate a strong local and systemic acute phase response (APR) as a result of homeostatic and physiological responses also induced by them. Acute phase proteins produced by cytokine activity are useful diagnostic markers that could also be used to monitor treatment response as they can be serially quantified. The objective of this study was to evaluate IFN- γ , TNF- α , IL-10, and TGF- β production in supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and monocytes (MO) cultures, and the serum acute phase response through total protein, albumin, globulins, C-reactive protein (CRP), α -1-acid glycoprotein (AGP), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) as regression markers of inflammatory response during pulmonary tuberculosis treatment. Twenty blood donors (G1) from the Blood Bank at Botucatu School of Medicine's University Hospital (HC-FMB) were evaluated once and 28 (G2) pulmonary tuberculosis patients: 13 from HC-FMB and 15 from the Bauru State Health Secretary. Patients were evaluated at three moments of treatment: before (M1), at three months (M2), and at the end (M3). Cytokines were determined in 20mL of peripheral blood (ELISA), with or without activation: LPS for MO culture and PHA for PBMC culture. Acute phase protein behaviour in G2 throughout treatment was: Globulins: M1>M2, M1>M3 ($p<0.001$); CRP: M1>M2>M3, ($p<0.001$); AGP for men: M1>M2, M1>M3 ($p<0.001$); ESR for men: M1>M2, M1>M3 ($p<0.0016$) and for women: M1>M2 ($p<0.025$). Comparison between cytokine levels found in supernatant of monocyte and peripheral blood mononuclear cells cultures, with and without stimulus, in G1 and G2 during treatment showed: TNF- α (with/without LPS) at M1: G2>G1; at M2: G2>G1 ($p<0.001$); (without LPS) at M3: G2>G1 ($p<0.001$), (with LPS) at M3: G2>G1

($p < 0.028$); IFN- γ (with and without PHA) at M1: $G2 > G1$; at M2: $G2 > G1$ ($p < 0.001$); IL-10 (with and without LPS) at M1: $G2 > G1$; at M2: $G2 > G1$; at M3: $G2 > G1$ ($p < 0.001$); TGF- β (with and without LPS) at M1: $G2 > G1$; at M2: $G2 > G1$ ($p < 0.001$), (without LPS) at M3: $G2 > G1$ ($p < 0.001$). In G2 all cytokines in supernatants of monocyte and peripheral blood mononuclear cells cultures, with and without stimulus, showed: $M1 > M2 > M3$ ($p < 0.01$). Levels of globulins, CRP, AGP, and ESR in patients with pulmonary tuberculosis before treatment (M1) were significantly higher than reference values, suggesting their use as diagnostic markers and indicate treatment. The CRP decreasing values along treatment could be taken as a marker of the regression of inflammatory process and of response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. Regarding cytokines, there was significant increase in the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10, and TGF- β before and at three months treatment, with and without stimulus; and of TNF- α , IL-10 with and without stimulus as well as of TGF- β without stimulus at six months. Patients had higher levels than controls of all studied cytokines before treatment, and these values decreased along treatment. In this study, pulmonary tuberculosis patients showed a Th0 cytokine profile before treatment, with the production of both Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-10) cytokines, in addition to TNF- α inflammatory and TGF- β regulatory and fibrosis inducer cytokines. At the end of treatment all had evolved to Th2 profile, probably in an attempt to reduce the harmful effects of the proinflammatory activity of the Th1 cytokine profile and of the still above normal levels of TNF- α . The high levels of TGF- β also found in these patients are related to its important role in the extracellular matrix deposition and fibrosis induction that characterize tuberculosis healing process. IFN- γ was the only cytokine reaching normal levels at the end of treatment, which suggests its use as a marker for response to treatment.

Apêndices



Apêndice I

Valores de Proteínas totais de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos		
	1	2	3
1	8,2	6,5	6,8
2	7,81	7,4	7,7
3	7,4	7,8	7,8
4	7,7	6,2	8,4
5	7,6	7,8	7,9
6	7,2	8,5	7,7
7	6,9	7	7,7
8	8,8	8,8	8
9	8,2	8,8	8,1
10	8,4	7,6	8,5
11	8,4	7,3	6,4
12	8,8	7,4	7,4
13	8,2	7,7	7,9
14	8,3	8,1	8,6
15	7,4	7,6	7,6
16	8,4	7,2	7,8
17	6,7	6,5	7,2
18	7,8	7,3	8,3
19	8,7	7,6	8,4
20	7,9	7,1	7,1
21	7,5	7,2	5,9
22	8	7,4	
23	7,3	7,6	
24	8,2	7,5	
25	7,5	7,3	
26	7,5	7,5	
27	6,8	9,3	
28	5,5	6,9	

Valor de referência: 6,3 a 8,2 g/dl

Momentos:

M1 (antes)

M2 (3 meses)

M3 (final do tratamento)

Obs:

1) 21 pacientes possuem 3 momentos

2) 7 possuem 2 momentos

Apêndice II

Valores de Albumina de G2 (Pacientes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos		
	1	2	3
1	3,4	2,5	2,6
2	3,21	3,7	4
3	3,4	4,4	4,4
4	4,3	3,6	2,1
5	3,9	4,4	4,9
6	3,4	4,4	4,4
7	2,9	3	4,2
8	3,7	5,3	4,7
9	3,3	4,2	4,3
10	4,6	4,5	4,9
11	3,7	4	3,6
12	4,6	4	4,3
13	4,9	4,4	4,6
14	4,1	4,1	4,8
15	4,2	4,2	4,2
16	4,6	4,1	3,8
17	4,9	3,8	3,9
18	3,7	3,7	4,1
19	5	4,2	4,3
20	4,4	4,2	4,5
21	3,9	4,2	3,3
22	4,1	3,9	
23	3,9	4,5	
24	4	3,9	
25	3,7	4,2	
26	3,4	4,2	
27	2,5	3,8	
28	2,1	2,3	

Valor de referência: 3,5 a 5,0 g/dl

Momentos:

M1: antes

M2: 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

21 - possuem três momentos

7 - possuem somente dois momentos

Apêndice III

Valores de globulina de G2 (Grupo com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos		
	1	2	3
1	4,8	4	4,2
2	4,6	3,7	3,7
3	4	3,4	3,4
4	3,4	2,6	3,3
5	3,9	3,4	3
6	3,8	4,1	3,3
7	4	4	3,5
8	5,1	3,5	3,3
9	4,9	4,6	3,8
10	3,8	3,1	3,6
11	4,7	3,3	2,8
12	4,2	3,4	3,1
13	3,3	3,3	3,3
14	4,2	4	3,8
15	3,2	3,4	3,4
16	3,8	3,1	4
17	1,8	2,7	3,3
18	4,1	3,6	4,2
19	3,7	3,4	4,1
20	3,5	2,9	2,6
21	3,6	3	3,6
22	3,9	3,5	
23	3,4	3,1	
24	4,2	3,6	
25	3,8	4,1	
26	4,1	3,3	
27	4,3	5,5	
28	3,4	4,6	

Valor de referência: 2,8 a 3,2 g/dl

Momentos:

M1: antes

M2: 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

21 - possuem 3 momentos

7 - possuem somente 2 momentos

Apêndice IV

Valores de Proteína C reativa de G2 (Grupo Tb Pulmonar)

Pacientes	Momentos		
	1	2	3
1	*	1,3	1,3
2	13,1	1,7	0,2
3	9	3,4	1,1
4	0	0,1	0
5	8,5	0,3	0
6	9	1,5	0,3
7	9	2,1	0,5
8	4,3	0	0
9	3,5	0,7	0,2
10	1,1	1,2	0,1
11	3,4	1,2	1
12	3,9	0,4	0
13	0,8	0,5	0
14	3,8	3,5	0,2
15	2,3	1,4	0
16	0,4	0,1	0
17	2,7	1,2	1,5
18	0,5	0,3	0
19	3,8	2,8	0,1
20	4,7	0,2	0,2
21	2,3	0,6	0,5
22	2,4	0,4	
23	16,6	2,1	
24	1,3	0,1	
25	0,7	0,1	
26	17,4	0,1	
27	11,3	3,9	
28	17,8	19	

Valor de referência: $\leq 1,00$ g/dl

Momentos:

M1: antes

M2: 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

- 21 possuem 3 momentos

- 7 possuem 2 momentos

*não possui valor em M1

Apêndice V

Valores de alfa-1 glicoproteína ácida de G2 (Grupo Tb pulmonar)

Pacientes		Momentos		
		1	2	3
1	M	*	13,2	39
2	F	236	33	36
3	M	205	93	88,3
4	M	126	41,8	56,4
5	M	157,4	58	51
6	M	152	48,5	70
7	M	128	105,1	70,6
8	M	87	79	91
9	F	35	115	45
10	M	79	78,2	67
11	M	110	63,4	73
12	F	174	39	41
13	M	49	124	81
14	M	99	60	52,1
15	M	87	30	33,2
16	M	203	82	101,2
17	M	49	34	48
18	F	168	132	53,9
19	M	89	46	33,7
20	M	110	48	40,4
21	M	116	88	37,9
22	M	100	158	
23	M	207	127	
24	F	26	12	
25	M	118	42	
26	M	108	70	
27	M	134	72	
28	M	157	25	

Valor de referência: Homem: 50 - 130 g/dl

Mulher: 40 - 120 g/dl

Momentos:

M1: antes

M2: 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

- 21: 3 momentos

- 7: 2 momentos

* não possui valor referente a M1

Apêndice VI

Valores de VHS de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Sexo	Momentos		
		1	2	3
1	M	***	***	40
2	F	44	10	***
3	M	20	37	15
4	M	23	***	2
5	M	14	***	1
6	M	51	41	27
7	M	48	***	***
8	M	54	19	14
9	F	35	33	34
10	M	13	***	18
11	M	21	15	1
12	F	71	14	7
13	M	40	18	16
14	M	90	35	14
15	M	11	5	5
16	M	38	28	***
17	M	11	9,5	5
18	F	115	35	17
19	M	8	6	5
20	M	82	11	7,5
21	M	26	5	7
22	M	51	10	
23	M	88	49	
24	F	60	8	
25	M	45	17	
26	M	140	14	
27	M	55	55	
28	M	50	45	

Valores de referência: Homem: até 10 mm/h

Mulher: até 20 mm/h

Momentos:

M1: antes

M2: aos 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

- 21 possuem 3 momentos

- 7 possuem somente 2 momentos

*** não realizou o exame

Apêndice VII

Valores de IFN-gama de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos					
	1		2		3	
	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo
1	418	547	516	610	421	584
2	314	416	216	288	180	248
3	321	387	217	246	208	221
4	286	346	320	481	210	281
5	480	561	307	316	186	241
6	327	418	218	264	204	222
7	817	981	789	896	511	704
8	210	384	181	294	111	139
9	418	526	217	340	140	209
10	646	780	651	774	591	762
11	680	720	581	619	288	431
12	904	1060	788	861	216	417
13	481	517	386	417	290	310
14	342	407	286	330	206	387
15	681	746	488	518	204	293
16	704	863	361	394	341	381
17	826	866	810	911	611	704
18	463	581	241	304	180	246
19	640	761	618	710	341	404
20	486	720	341	611	281	340
21	733	994	707	816	488	720
22	801	926	781	900		
23	826	896	721	788		
24	584	617	500	581		
25	431	499	241	288		
26	794	918	410	444		
27	248	281	381	490		
28	825	990	630	671		

Momentos:

M: antes

M2: 3 meses

Pacientes:

1) 21 possuem 3 momentos

2) 7 possuem somente 2 momentos

Apêndice VII

Valores de referência para as citocinas TNF-alfa, IFN-gama, IL-10 e TGF-beta de G1 (grupo de doadores de sangue)

Controles	Idade	sexo	TNF-alfa		IFN-gama		IL-10		TGF-beta	
			s/estímulo	c/estímulo	s/estímulo	c/estímulo	s/estímulo	c/estímulo	s/estímulo	c/estímulo
1	31	M	84	111	121	240	10	21	92	217
2	41	M	133	241	201	256	15	27	118	428
3	28	M	101	204	236	304	14	20	135	613
4	38	M	118	206	226	284	21	36	230	646
5	52	M	110	196	286	380	26	38	236	417
6	45	M	81	104	210	309	0	5	204	417
7	48	M	166	304	306	366	6	12	142	306
8	33	M	181	318	204	296	6	10	96	294
9	56	M	126	274	246	322	5	12	224	587
10	31	M	86	126	294	381	15	20	201	489
11	36	M	121	202	330	384	11	19	143	471
12	27	M	106	218	346	381	0	7	208	481
13	43	M	120	181	206	291	5	12	242	608
14	47	M	105	118	263	300	15	18	129	374
15	24	M	128	231	270	296	5	10	118	349
16	25	M	190	284	284	321	7	10	201	404
17	35	M	96	113	188	246	5	16	163	454
18	37	M	156	206	248	296	16	29	142	484
19	36	M	121	201	181	304	0	0	221	599
20	48	M	180	246	301	369	6	14	281	531

Momento:

O G1 possui apenas um momento para obtenção dos valores de referência

Apêndice IX

Valores de TNF-alfa de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos					
	1		2		3	
	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo
1	126	218	101	148	81	121
2	630	821	411	632	149	161
3	416	504	381	426	342	488
4	489	526	212	311	106	214
5	381	466	240	318	120	209
6	638	820	417	521	206	281
7	288	361	241	355	246	361
8	317	441	294	381	98	162
9	540	620	320	444	110	126
10	321	488	331	492	320	484
11	488	580	231	417	143	201
12	287	318	191	231	148	216
13	620	788	246	291	98	161
14	804	981	304	447	214	388
15	510	584	621	786	273	584
16	544	680	310	394	410	511
17	410	495	281	386	183	214
18	710	804	610	780	441	520
19	581	710	431	701	221	536
20	689	804	517	610	286	301
21	402	630	520	849	410	510
22	303	391	284	291		
23	510	600	401	330		
24	304	417	263	407		
25	630	641	416	506		
26	446	804	388	520		
27	236	417	216	384		
28	617	741	421	494		
Momentos:	Pacientes:					
M: antes	1) 21 possuem 3 momentos					
M2: 3 meses	2) 7 possuem somente 2 momentos					
M3: final do tratamento						

Apêndice X

Valores de IL-10 de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos					
	1		2		3	
	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo
1	20	36	10	18	10	21
2	56	88	26	46	10	21
3	81	97	78	104	75	98
4	59	76	55	68	46	65
5	38	56	16	26	8	17
6	37	61	26	44	15	21
7	84	101	69	88	46	60
8	36	44	16	26	5	10
9	38	61	16	27	10	15
10	42	68	44	72	41	68
11	46	73	33	56	16	24
12	101	136	77	81	33	63
13	88	96	63	81	54	61
14	104	138	62	86	48	61
15	63	81	44	51	20	36
16	51	77	29	26	26	21
17	74	88	46	62	31	44
18	51	74	31	34	10	10
19	83	94	70	76	31	33
20	49	73	41	60	22	44
21	66	84	42	61	21	44
22	45	59	41	50		
23	63	86	52	62		
24	51	74	46	70		
25	49	63	40	61		
26	46	84	31	40		
27	61	86	33	51		
28	104	196	44	63		

Momentos:

M1: antes

M2: 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

1) 21 possuem 3 momentos

2) 7 possuem somente 2 momentos

Apêndice XI

Valores de TGF-beta de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar)

Pacientes	Momentos					
	1		2		3	
	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo	s/ estímulo	c/ estímulo
1	885	1121	544	863	364	505
2	788	940	381	617	240	388
3	944	1022	874	991	792	903
4	630	820	426	517	184	242
5	390	518	261	404	186	321
6	533	728	318	646	204	334
7	689	794	504	596	401	477
8	508	721	346	536	303	399
9	630	817	410	630	216	240
10	218	468	230	480	230	472
11	518	786	384	651	291	330
12	340	641	280	410	220	313
13	588	789	621	781	289	996
14	746	904	661	823	237	441
15	804	1016	798	874	448	506
16	517		420	680	391	549
17	820	1120	710	940	301	717
18	610	694	421	517	340	356
19	794	939	649	717	387	390
20	536	880	388	610	241	440
21	880	1031	717	930	420	680
22	536	817	533	781		
23	642	881	543	620		
24	630	942	633	894		
25	633	963	594	892		
26	400	621	311	384		
27	680	816	417	522		
28	720	842	444	581		

Momentos:

M1: antes

M2: 3 meses

M3: final do tratamento

Pacientes:

1) 21 possuem 3 momentos

2) 7 possuem somente 2 momentos

3) 16 não possui valor da citocina com estímulo em M1