

Sônia Maria Usó Ruiz Silva

**Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento
endotelial vascular durante o tratamento da tuberculose
pulmonar em relação às citocinas e provas de fase aguda.**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^ª Dra. Jussara Marcondes Machado

Botucatu

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

Usó, Sônia Maria Ruiz Silva.

Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento endotelial vascular durante o tratamento da tuberculose pulmonar em relação às citocinas e provas de fase aguda / Sônia Maria Usó Ruiz Silva. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientadora: Jussara Marcondes Machado

Assunto CAPES: 43000005

1. Pulmões - Doenças 2. Tuberculose pulmonar - Tratamento

CDD 616.995

Palavras chave: VEGF; Citocinas; Provas de fase aguda; Tratamento;
Mycobacterium tuberculosis.

*“A sutileza do pensamento consiste em descobrir a
semelhança das coisas diferentes e a diferença das coisas
semelhantes.”*

Montesquieu

*“Grandes realizações são possíveis quando se dá atenção
aos pequenos começos.”*

Lao-Tsé

Dedicatória

Ao Paulo, meu marido e grande amor, sempre ao meu lado, me encorajando e incentivando. Obrigada por me escolher para caminharmos juntos e por fazer de mim uma pessoa tão feliz!

A você todo meu amor!

Aos meus amados filhos Renata e Gustavo, meu maior sonho já conquistado! O amor de vocês torna suave, cada dificuldade encontrada no caminho.

Meu amor por vocês é imenso e eterno!

Aos meus pais, pelo amor a mim dedicado e por me ensinarem o verdadeiro valor da vida. À minha querida mãe, Maria Usó, uma doce guerreira, que com seu exemplo me ensinou que é possível lutar pelos nossos ideais e ao mesmo tempo observar a beleza do caminho percorrido!

Obrigada por tudo!

Ao meu amigo e irmão Mário Wilson, e Cecília Odete pelo carinho e amizade!

Ao meu querido avô, Manoel Usó sempre caminhando ao meu lado!

Que saudades de você!

Agradecimentos

Com carinho especial

*À, Dra Jussara Marcondes Machado, uma pessoa tão querida!
Mestra e amiga, que durante esses anos me orientou com sabedoria, dedicação e
incentivo e a quem tanto admiro e respeito!
Você é um daqueles presentes raros que a vida nos dá!
Muito obrigada, por tudo!*

*À minha grande e querida amiga Fátima Regina Vilani Moreno, tão
verdadeira e sincera!
Não tenho palavras para agradecer seu carinho, generosidade e disposição em
me auxiliar durante essa caminhada.
Obrigada por tudo!*

À Sueli Aparecida Calvi, pela atenção, amizade e pelo grande auxílio prestado!

*Agradeço sobretudo à Deus, por permitir esta grande conquista, ao lado de
tantas pessoas maravilhosas que me ajudaram a tornar possível este sonho!*

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram comigo nesta caminhada

Ao Dr Paulo Câmara Marques Pereira e Dra Sueli Aparecida Calvi pelas valiosas sugestões durante a qualificação que enriqueceram este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, que exemplarmente repassaram conhecimentos tão necessários para a realização deste estudo.

À Solange Sato Cagliari, sempre tão atenciosa e gentil que, no decorrer desses anos, se tornou uma amiga querida.

À Secretária Municipal de Saúde de Bauru, Dra Tereza Maria S. Faiffer, pela anuência ao projeto.

Ao Dr Carlos Eduardo Sacomandi, pela valiosa ajuda e por permitir que os pacientes fossem consultados para participar da pesquisa.

Ao Dr Rinaldo Pôncio Mendes por autorizar a coleta de dados necessários ao estudo, contidos nos prontuários dos pacientes.

Agradecimentos

Ao Dr José Mauro Zanini, Diretor do Hemocentro de Botucatu, por autorizar a participação dos doadores de sangue e à estes, que de maneira altruísta colaboraram como controle, nesta pesquisa.

Aos funcionários do Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Saúde de Bauru, especialmente às funcionárias Ângela, Margarida, Josita, Denise, Conceição, Mara, Sílvio, à enfermeira Roberta e à Diretora Sílvia pela cooperação e boa vontade demonstrada durante todo o período de desenvolvimento deste estudo. O carinho e dedicação desses funcionários com os pacientes, é o mais belo exemplo de vida!

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia do Instituto Lauro de Souza Lima, Márcia, Débora, Érika, Lariza, Sandra, Iracema e Nice, pela amizade, carinho e pelo inestimável auxílio prestado durante todo o desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do Laboratório Clínico do Instituto Lauro de Souza Lima, sempre atenciosos, por me auxiliarem de maneira exemplar durante a execução da pesquisa, Mara, Fatiminha, Jô, Bia, Ceine, Juliana, Verônica, Cássia, Daerce, Zulmira, Nádia, D. Amália, Izilda, Camila e Heloísa. Com carinho especial ao Dr Dirceu, Dalpino, uma pessoa amiga e um exemplo de dedicação e capacidade.

Agradecimentos

Aos funcionários da Pós-Graduação de Botucatu, Regina Célia Espadin, Nathanael Pinheiro Salles, Lília Cristina Bianchi, Ana Paula Devidé e Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, sempre tão atenciosos e prontos para esclarecer nossas dúvidas.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa, pelo auxílio prestado neste estudo, principalmente ao Hélio Rubens de Carvalho Nunes pelo auxílio no tratamento estatístico, ao Collin Edward Knaggs pela versão do texto para o inglês e à secretária Juliana Cristina, sempre tão atenciosa e solícita.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP de Botucatu, Selma Maria de Jesus, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas e Rosemary Cristina da Silva, pela execução da ficha catalográfica.

Aos meus verdadeiros e queridos amigos, que me apoiaram e incentivaram durante essa caminhada. A vocês, todo meu carinho e meu sincero obrigado!

Ao amigo James Venturini, que muito me ajudou durante todo esse período que compartilhamos na luta pelos nossos objetivos.

À Eliana Peresi pela contribuição durante o estudo.

Agradecimentos

A amiga e Chefe da Seção de Microbiologia do Instituto Lauro de Souza Lima, Suzana Madeira Diório, por tornar possível o desenvolvimento deste projeto, apoiando e dando condições de viabilizar as coletas externas.

À querida amiga Érika Mozer, responsável pela formatação da tese, que desprendidamente e de coração, dedicou seu tempo para tornar esteticamente mais belo este estudo. Muito obrigada por isso!

Às funcionárias da gráfica do Instituto Lauro de Souza Lima, Maria José, Hildebrando, Sueli e Terezinha que gentilmente através de sua habilidade incontestável, foram responsáveis pela encadernação destes volumes.

De modo especial aos pacientes, a quem também posso chamar de amigos após a convivência de seis meses, que gentilmente concordaram em participar do estudo, tornando possível esta pesquisa.

A vocês, meu sincero agradecimento e a esperança de poder um dia, encontrar um caminho que possa ajudá-los!

Sônia Maria Usó Ruiz Silva

**Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento
endotelial vascular durante o tratamento da tuberculose
pulmonar em relação às citocinas e provas de fase aguda.**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a Dra. Jussara Marcondes Machado

Botucatu

2008

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	01
1. Tuberculose	01
2. A Resposta Imune na Tuberculose	05
3. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	13
4. Resposta de fase aguda.....	16
5. Justificativa do Estudo	20
II - OBJETIVOS	23
III - CASUÍSTICA e MÉTODOS.....	26
1. Casuística.....	26
2. Métodos	26
2.1 Constituição dos grupos	26
2.2 Diagnóstico de Tuberculose:	28
2.2.1 Identificação do bacilo: baciloscopia e cultura	28
2.2.2 Exames de Imagem	29
2.2.3 Exame histopatológico	29
2.3 Coleta de sangue.....	30
2.4 Determinação das citocinas.....	31
2.4.1 No soro.....	31
2.4.2 No sobrenadante de cultura celular	32
2.5 Determinação de VEGF	33
2.6 Determinação das proteínas de fase aguda e do VHS	34
2.7 Análise estatística:.....	35

IV - RESULTADOS.....	38
V - DISCUSSÃO	72
VI – CONCLUSÕES.....	100
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
RESUMO	129
ABSTRACT	132
APÊNDICES.....	135
ANEXOS	148

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Tuberculose

Entre as doenças infecciosas que atingem a humanidade, a tuberculose (TB), apesar dos esforços para sua eliminação, permanece como um dos principais problemas de saúde pública na maioria dos países ⁽¹⁾. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial, cerca de dois bilhões de pessoas, está infectada com o bacilo, sendo que 5% a 10% desses indivíduos apresentam o risco de desenvolver a tuberculose ativa, num período de um a dois anos após a infecção e 3,5% a 6 % perderão a vida em virtude da doença ^(2,3). Ainda, a cada ano, surgem oito milhões de novos casos de tuberculose no mundo, levando à morte três milhões de pessoas. No Brasil, estima-se em mais de 50 milhões o número de indivíduos infectados. São cerca de 90.000 casos novos por ano, mas, como há casos não notificados, calcula-se que esse número seja ainda maior, podendo chegar a 130.000⁽²⁾.

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa crônica, causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) que se dissemina pelo ar através de gotículas de saliva expelidas pela tosse, fala ou espirro dos doentes. Assim, o contágio se dá com maior frequência pelas vias respiratórias, indo o bacilo se alojar preferencialmente no tecido pulmonar, rico em oxigênio, ali permanecendo por tempo indefinido, contido pelas células de defesa. Na grande maioria das vezes,

a micobactéria é destruída nesse estágio pelos macrófagos alveolares ou permanece na forma de infecção latente. Em uma minoria de casos, desenvolve-se a doença ativa (tuberculose primária) preferencialmente no pulmão, embora possa atingir qualquer tecido do organismo após disseminação hematogênica. A destruição do bacilo depende inicialmente da capacidade microbicida intrínseca dos macrófagos alveolares e dos fatores de virulência da micobactéria. Em decorrência da diminuição da imunidade, em situações de desnutrição, subnutrição, stress ou presença de outras condições mórbidas, como a aids, tende a reativar-se. Quando isso acontece, tem-se a doença, que pode provocar graves lesões no tecido, ocasionadas pelas próprias defesas do organismo, na tentativa de eliminar o bacilo^(1,4). A infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) tem sido considerada o maior fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose. Estima-se que o risco do portador do HIV de adoecer, pela infecção com o bacilo seja de 7% a 10% ao ano, enquanto o não portador, de 10% durante toda sua vida (0,3% ao ano)⁽²⁾.

A tuberculose foi responsável por milhões de mortes no passado. A introdução da vacina BCG, trinta e nove anos após a descoberta do bacilo, da quimioterapia e de medidas profiláticas reduziu drasticamente a letalidade da doença e sendo essa situação mantida por várias décadas. Embora o combate à tuberculose tenha reduzido consideravelmente a ocorrência da doença nos países desenvolvidos, dados históricos, calculados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), indicam

que não foram observados grandes efeitos na redução do problema global, desde a descoberta do bacilo por Robert Koch, em 1882. Assim, em 1993, a OMS declara a tuberculose uma emergência global de saúde pública, estabelecendo como meta o controle /erradicação da doença até o ano de 2015, o que significa um grande desafio, principalmente para a África e o leste europeu.

Atualmente o esquema de tratamento preconizado pela OMS é baseado na utilização de quatro antimicrobianos de primeira linha, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol em tratamento diretamente observado (DOT) durante seis meses. Essa medida, que tem por objetivo evitar o abandono e prevenir o aparecimento de resistência às drogas, tem resultado em alta porcentagem de cura.⁽⁵⁻⁸⁾

No entanto, apesar da disponibilidade de quimioterapia efetiva e da proteção moderada da vacina BCG, a incidência global de TB tem aumentado consideravelmente. Esse aumento tem sido, em grande parte, causado pelas linhagens de mutantes resistentes – MDR (do inglês, *MultiDrug-Resistants*) às duas principais drogas antimicrobianas, rifampicina e isoniazida e, mais recentemente, a linhagens resistentes a pelo menos três das seis principais drogas de segunda linha – XDR (do inglês, *eXtensively Drug-Resistants*)⁽⁸⁻¹⁰⁾. Essa condição é extremamente alarmante. Estudos recentes estimam 458.000 novos casos de tuberculose MDR ocorrendo no mundo em 2003, o que significa 3,2% do total de casos novos de

tuberculose ^(8,11,12). Em consequência disso e de outros fatores, como a recente pandemia HIV/aids, o número de doentes volta a preocupar os órgãos de saúde ⁽¹⁾.

No sistema prisional, a alta incidência da tuberculose, decorrente do confinamento e aglomeração desses indivíduos, o número significativo de portadores do HIV, favorecendo a co-infecção tuberculose/aids, a demora para o diagnóstico e o abandono do tratamento colaboram com a rápida emergência de resistência as drogas ^(1,8).

O diagnóstico da tuberculose é tradicionalmente realizado pela identificação do bacilo álcool ácido resistente (BAAR) em esfregaços, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, de material proveniente de pacientes com suspeita clínica da doença. É método de fácil execução e baixo custo, sendo também utilizado para acompanhar a eficácia do tratamento na tuberculose pulmonar, verificada pela redução bacilar e pelo desaparecimento do agente no escarro. No entanto, apresenta baixa sensibilidade, sendo necessária a presença de pelo menos 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro para que sejam detectados ^(13,14). O método mais sensível e específico, disponível até o momento, para o diagnóstico da tuberculose pulmonar e extra-pulmonar, é o isolamento da micobactéria em cultura. É o método ideal para amostras paucibacilares, como ocorre em pacientes com aids, sendo capaz de detectar a partir de 10 bacilos viáveis por mililitro de amostra. A cultura também é de grande valor no acompanhamento do tratamento em casos de suspeita de resistência, por permitir a identificação da micobactéria cultivada e a realização do

teste de sensibilidade. No entanto, por se tratar de bacilo de crescimento lento, são necessários até 60 dias para se obter um resultado positivo ^(13,14). Embora atualmente existam métodos mais rápidos para cultivar o bacilo, como o Middlebrok 7H9, BACTEC, MGIT, entre outros, além do alto custo, esses continuam demandando tempo relativamente longo, de aproximadamente 28 dias, até o diagnóstico, pois são necessárias 10^3 unidades formadoras de colônias para a definição do resultado ⁽¹⁵⁾.

Desse modo, testes capazes de avaliar mais rapidamente a resposta ao tratamento de pacientes com tuberculose, permitindo que se detectem, em menor espaço de tempo, os possíveis casos de resistência, são extremamente valiosos.

2. A Resposta Imune na Tuberculose

A interação entre as várias populações de células imunocompetentes, particularmente entre macrófagos e linfócitos T, caracteriza a resposta imune mediada por células, importante para o controle de parasitas intracelulares, como é o caso do agente da tuberculose ^(15,16). Após a penetração do *M. tuberculosis* no pulmão, tem início a resposta de defesa contra a infecção, que envolve a interação das glicoproteínas de superfície da micobactéria com os receptores de superfície dos macrófagos alveolares. O reconhecimento de produtos micobacterianos, principalmente lipoarabinomanana (LAM), principal componente da parede celular, e lipopolissacarídeos (LPS), pelos receptores TLR (do inglês, *Toll-Like Receptors*),

mediadores transmembrana filogeneticamente conservados na imunidade inata, presentes nos macrófagos, é essencial para a sinalização e desenvolvimento da resposta imune^(16,17). Essa interação leva à ativação celular e produção de citocinas, proteínas de baixo peso molecular, secretadas principalmente pelos leucócitos T-*helper* (Th) e macrófagos. Essas proteínas se ligam a receptores específicos de membrana das células-alvo, em geral com grande afinidade, enviando sinais que alteram a expressão dos genes dessas células, mediando efeitos biológicos complexos de interação entre linfócitos, células inflamatórias e hematopoiéticas, extremamente importantes para o desenvolvimento de resposta imune efetiva. As citocinas podem ser dosadas no sangue periférico, em culturas de células e outros materiais biológicos, revelando, assim, o perfil de células Th presentes no paciente e definindo qual deles predomina: Th1, Th2 ou ainda Th0, o que determina, em parte, a fase da infecção^(16,17,18).

Assim, células Th1 produzem interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ), substâncias que promovem reações de defesa mediadas por macrófagos e outros fagócitos, sendo responsáveis pela morte intracelular de patógenos, enquanto as células Th2 produzem principalmente IL-4 e IL-10, que induzem a diferenciação de células B e antagonizam Th1⁽¹⁹⁻²²⁾. Ambas parecem derivar de uma célula T precursora comum, envolvendo um estágio intermediário Th0, capaz de secretar tanto IFN- γ quanto IL-4, com capacidade de se diferenciar em qualquer dos dois subtipos^(19,23). Na realidade, um subtipo inibe o desenvolvimento do outro^(19,20,23,24).

Antes que se desenvolva completamente a resposta imune adaptativa, as células *Natural Killer* (NK), em resposta a IL-12 e IL-18, ou pelo reconhecimento direto dos antígenos micobacterianos, são as principais produtoras de INF- γ , seguidas dos macrófagos alveolares e células T expressando receptores gama - delta (T $\gamma\delta$) e T CD1^(15,16,25). As células T $\gamma\delta$ são capazes de reconhecer diretamente pequenas proteínas micobacterianas na ausência de moléculas apresentadoras de antígenos, assim como as T CD1 restritas, que são capazes de desencadear a atividade citotóxica^(15,16,25).

O INF- γ , importante para o controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, secretado pelos linfócitos T CD4 e células NK, ativa os macrófagos alveolares, que passam a produzir reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio, envolvidos na inibição do crescimento e morte da micobactéria, e IL-12, levando a uma retro-alimentação positiva que amplifica essa via^(26,27). Existem estudos que demonstraram que aerosol de INF- γ , administrado a indivíduos normais, é capaz de ativar os macrófagos alveolares⁽²⁸⁾. No entanto, uma vez dentro do macrófago, o *M. tuberculosis* tem habilidade de persistir no compartimento fagossômico, inibindo a fusão do lisossomo e impedindo a ação das enzimas líticas, permanecendo, assim, na forma latente^(29,30). Há evidências de que a micobactéria é capaz de produzir amônia, substância que, alcalinizando o meio, poderia inibir a fusão do fagolisossoma ou a ação das enzimas líticas⁽²⁹⁾. O INF- γ estimula a expressão do antígeno, pela molécula MHC classe II e suprime a produção das citocinas IL-4 e

IL-10 e, por consequência, a ação do perfil Th2^(20,30). A administração de IFN- γ a pacientes com tuberculose pulmonar causada por bacilos MDR levou à melhora no quadro clínico, com ganho de peso, diminuição das lesões cavitárias e eliminação dos bacilos no escarro⁽³¹⁾. Estudos recentes associam a produção de IFN- γ in vitro, por células T estimuladas com antígenos específicos, ao diagnóstico da tuberculose^(15,32-34). Todos esses experimentos confirmam o importante papel do IFN- γ na defesa do hospedeiro e sua possível ação primária na ativação do macrófago.

Além de IFN- γ , o *M. tuberculosis* induz a secreção de TNF- α por macrófagos, células dendríticas e células T. Essa citocina é importante para o controle da infecção aguda pelo bacilo, por seu papel na inflamação local e na ativação de macrófagos, sendo essencial para a formação e manutenção do granuloma^(20,24,26). TNF α influencia a expressão de moléculas de adesão, bem como de quimiocinas e seus receptores, induzindo a migração celular para o local da infecção, impedindo, assim, a disseminação da infecção⁽²⁶⁾.

Sobrevivendo no interior do macrófago, o *M. tuberculosis* causa ativação contínua do linfócito T, leva à grande produção das citocinas pro-inflamatórias IFN- γ e TNF- α e à formação do granuloma funcional, que sofre necrose central caseosa pela ação das enzimas lisossômicas, líticas para o tecido. A necrose caseosa é cercada por grande quantidade de macrófagos ativados e células epitelióides, ótimas produtoras de TNF- α , circundados por linfócitos T CD4+ e T CD8+, numa batalha contínua para conter a infecção e a reativação da doença^(16,19,20). Embora com efeito

protetor, o TNF- α , em altas concentrações, pode representar importante fator de imunopatogenia da doença relacionada com destruição tecidual ^(35,36).

Hernandez-Pando *et al* ⁽³⁷⁾, estudando camundongos infectados com *M. tuberculosis*, por instilação intratraqueal, demonstraram que a produção rápida de IL-2 e IFN- γ , no início da infecção e em atividade sinérgica com IL-1 e TNF- α , levava à eliminação da micobactéria ⁽³⁷⁾. Estudo imuno-histoquímico do pulmão de camundongos infectados mostrou, também, que, na fase inicial da tuberculose, há grande número de células expressando IL-2 que, juntamente com TNF- α e moléculas de adesão, contribuem para a formação do granuloma ⁽³⁸⁾. Com o tempo, no entanto, ocorre uma diminuição da produção de citocinas do perfil Th1, e aparecem células expressando citocinas do perfil Th2, que promovem a desativação dos macrófagos, contribuindo para o controle da resposta inflamatória. ⁽³⁸⁾.

Estudo experimental em camundongos com inoculação intra-peritoneal de *M. tuberculosis* demonstrou que, na fase aguda da infecção, predominam células T CD4+ com baixa expressão de IL-4 e de seus receptores no infiltrado inflamatório e no granuloma ⁽³⁹⁾. À medida que a infecção evolui para a formação do granuloma, aumenta a expressão de IL-4 e IL-10 e diminui a de IFN- γ , conforme relato de Orme *et al* ⁽⁴⁰⁾. Há autores que associam o aumento de citocinas representativas do perfil Th2 às formas mais avançadas da doença, enquanto que o predomínio de IFN- γ (perfil Th1), às suas formas leves. Já, o aumento concomitante de IL-4 e IFN- γ , indicando o perfil Th0, é associado à fase crônica e progressiva da doença ^(23,37).

No entanto, parece que a perda de controle dos rumos da infecção se deve, principalmente, à deficiência de IFN- γ , que pouco a pouco se vai notando, embora alguns estudos associem o avanço da tuberculose para formas mais graves ao aumento de IL-4 e de TGF- β , que suprimem a proliferação linfocitária e direcionam para o perfil Th2^(23,37).

Para antagonizar o excesso de resposta inflamatória, iniciada contra o *M. tuberculosis*, surgem os mecanismos antiinflamatórios, representados pelos receptores solúveis de TNF- α , que impedem a ligação desta citocina ao seu receptor, por bloqueio da sinalização, e pelas citocinas antiinflamatórias, IL-4, IL-10 e TGF- β .

A IL-10, citocina reguladora da resposta imune, é produzida pelos macrófagos e células T, durante a infecção pelo *M. tuberculosis*, e tem a propriedade de desativar os macrófagos e diminuir a produção de IL-12, para arrefecer a produção de IFN- γ ^(23,37). Desse modo, pode ser considerada a chave para proteção do hospedeiro contra o excesso de resposta tipo Th1, o que certamente deve ocorrer na fase em que o doente manifesta sinais e sintomas de tuberculose. A IL-10 estabelece verdadeiro equilíbrio entre a resposta imune protetora e a patológica, uma vez que altos níveis de IFN- γ e TNF- α levam à necrose tecidual^(36,37). A neutralização da ação do TNF- α pela IL-10 é conseguida pela indução da liberação de receptores solúveis para a primeira (TNF- α R2), formando-se complexos TNF-

TNFR, que limitam a função nociva do TNF- α ⁽³⁰⁾. A IL-10 pode atuar, ainda, inibindo diretamente a resposta de células T CD4+ ⁽³⁸⁾.

No entanto, ao lado de toda essa atividade antiinflamatória, a IL-10 também tem efeito antiapoptótico, que leva ao aumento da sobrevivência do macrófago infectado, garantindo um foco de produção contínua das citocinas pró-inflamatórias ⁽³⁸⁾. A dualidade da atividade pró- e antiinflamatória da IL-10 é bem demonstrada em experimento de camundongos transgênicos, que expressam constitucionalmente IL-10. Esses animais têm menor capacidade de contenção da infecção pelo Bacilo Calmette-Guérin (BCG), embora não tenham prejuízo da resposta de células T, incluindo a produção de IFN- γ ⁽³⁸⁾. Na tuberculose em atividade ocorre, ainda, a produção do fator transformador de crescimento beta (TGF- β), citocina produzida por linfócitos, macrófagos e células dendríticas, considerada um potente inibidor da ativação dos macrófagos, bem como da proliferação de linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos B ^(41,42). Participa na indução da fibrose em modelos experimentais de infecção pulmonar, como é o caso da inflamação produzida por micobactérias. O TGF- β é citocina pleiotrópica, com ação pró- e antiinflamatória, de acordo com sua concentração ⁽³⁷⁾. Assim, em modelo experimental, em baixas concentrações, na fase aguda da infecção, atua como fator quimiotático para monócitos e indutor de secreção de IL-1 α e TNF- α , atuando como ativador inflamatório. Ao contrário, na fase crônica da infecção, atinge nível máximo de produção iniciando um processo

antiinflamatório e de regeneração que pode ter influência na evolução e na imunopatologia da doença ⁽³⁷⁾.

O TGF- β pode estimular a proliferação e diferenciação de células T e também impedir a apoptose dessas células; pode, ainda, modular a expressão de moléculas de adesão e induzir a quimiotaxia de leucócitos, bem como de outras células inflamatórias. Além disso, inibe o efeito citotóxico e regula a expressão de moléculas MHC classe II ^(41,42).

Monócitos de pacientes tuberculosos têm capacidade aumentada de secretar TGF- β , *in vitro*, sob estímulo de antígenos micobacterianos ⁽⁴⁰⁾. Essa citocina apresenta ação inibidora sobre o sistema imune, por controlar a produção e função de TNF- α , IFN- γ e IL-1 e por inibir a indução do receptor de IL-12 e a ativação de macrófagos, o que resulta em diminuição da resposta oxidativa. Geralmente, o TGF- β é expresso de maneira mais significativa no sítio da infecção ativa pelo *M. tuberculosis* e, segundo Toosi *et al* ⁽⁴³⁾, tem papel central na imunopatogênese da tuberculose.

Othieno *et al* ⁽⁴²⁾, estudando culturas de células de sangue periférico de indivíduos PPD positivos, demonstraram efeito sinérgico do TGF- β e IL-10 na inibição da produção de INF- γ pelas células mononucleares, após desafio com PPD. Verificaram, ainda, a ação do TGF- β no aumento da produção de IL-10 pelos monócitos, sendo essa última dependente da concentração da primeira ⁽⁴²⁾.

Rojas *et al* ⁽⁴⁴⁾, estudando células TCD4+ e Tδγ, principais linhagens de células T ativadas pelo *M. tuberculosis*, não observaram efeito sinérgico entre TGF-β e IL-10. Relataram, no entanto, que as duas citocinas inibiam a resposta das células T CD4+ e Tγδ ao *M. tuberculosis*, por diferentes mecanismos de ação ⁽⁴⁴⁾.

Hirsh *et al* ⁽⁴⁵⁾, empregando cultura de 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 ⁽⁴⁵⁾.

3. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também conhecido como fator de permeabilidade vascular, é citocina multifuncional que tem sido alvo de muitos estudos pelo envolvimento que tem em importantes funções, como o aumento da permeabilidade vascular e pela ação angiogênica, principalmente em tumores malignos ^(46,47). Com base nessas funções, tem sido associada não apenas a tumores malignos, mas, também, a doenças inflamatórias crônicas, como a tuberculose ⁽⁴⁸⁾.

Na tuberculose pulmonar, trombose venosa profunda é evento clinicamente confirmado em 3% a 4% dos pacientes adultos, no entanto, a real incidência deve estar em torno de 10%, pelo fato de um terço dos casos ser inaparente ⁽⁴⁹⁾. Robson *et al* ⁽⁴⁹⁾, estudando a atividade fibrinolítica, a função plaquetária e os marcadores de

resposta de fase aguda em pacientes com tuberculose pulmonar grave, demonstraram ocorrer alterações hemostáticas que podem favorecer o desenvolvimento de estado de hipercoagulação. A ligação entre inflamação e complicações vasculares pode ser determinada pela resposta de fase aguda⁽⁴⁹⁾.

A inflamação pode promover a angiogênese, ou neovascularização, por meio do aumento da liberação do VEGF; de proteínas plasmáticas extravasadas, como o fibrinogênio; das células inflamatórias, como os macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos e por meio de citocinas, como o TNF- α , que além da atividade pró-inflamatória, também podem ter atividade angiogênica⁽⁵⁰⁾. No entanto, o mecanismo da neovascularização na tuberculose permanece, ainda, pouco conhecido.

A neovascularização é um processo de crescimento de novos capilares sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. É fundamental para embriogênese, crescimento, reparo tecidual após lesão e para o ciclo reprodutivo feminino. No entanto, pode representar mecanismo patogênico importante para a evolução do crescimento tumoral e das doenças inflamatórias crônicas. Estudos demonstram que o VEGF estimula a angiogênese na inflamação crônica, levando à neovascularização inflamatória pelo recrutamento de macrófagos^(48,51,52). Saita *et al*⁽⁵³⁾, inoculando Trealose 6,6'-Dimicolato (TDM) de *M. tuberculosis* em córnea de rato, provocaram reação granulomatosa associada à indução de angiogênese local. Citocinas pró-inflamatórias e VEGF foram detectadas no estágio inicial do processo. Verificaram, ainda, que, empregando anticorpos neutralizantes contra VEGF e IL-8, inibiam o

infiltrado inflamatório e a neovascularização no local do inóculo. Resultados semelhantes foram observados por Sakaguchi et al ⁽⁵⁴⁾, em tecido granulomatoso murino sob efeito de TDM.

Ozawa et al ⁽⁵⁵⁾, estudando mieloblastos de camundongos com expressão de VEGF, demonstraram que o microambiente é mais importante na indução da angiogênese que a concentração de VEGF.

Matsuyama et al ⁽⁴⁸⁾ demonstraram, em soro de pacientes com tuberculose ativa, aumento significativo da concentração de VEGF que diminuía durante o tratamento, paralelamente à melhora clínica. Ao contrário, de acordo com os autores, os níveis séricos de VEGF permaneciam altos em pacientes com tuberculose causada por bacilo MDR, mesmo com o tratamento. Observaram, ainda, que os níveis séricos dos pacientes com tuberculose em atividade eram significativamente diferentes daqueles encontrados em doentes com história pregressa de tuberculose, sugerindo que o VEGF poderia refletir a atividade da doença na forma pulmonar ⁽⁴⁸⁾. Estudos semelhantes, conduzidos por Alatas et al ⁽⁵⁶⁾, confirmam o aumento dos níveis séricos de VEGF na tuberculose antes do tratamento, em relação aos observados após a terapia, e sugerem sua indicação como marcador de atividade da doença. Até o momento, não se conhecem estudos que associem o VEGF às citocinas pró- e antiinflamatórias, assim como à resposta de fase aguda, em um mesmo grupo de pacientes, com a finalidade de avaliar seu

potencial como marcador de atividade da tuberculose pulmonar em relação ao tratamento.

4. Resposta de Fase Aguda

Este termo é utilizado para indicar os diversos efeitos sistêmicos que acompanham a inflamação, isto é, alterações na concentração plasmática de muitas proteínas sintetizadas no fígado, juntamente com uma grande variedade de alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais. Do ponto de vista clínico, essa resposta se caracteriza principalmente por febre, anemia, leucocitose, anorexia, e perda de peso. Na tuberculose em atividade, a reação de fase aguda é forte ^(57,58).

A maioria dos diferentes elementos da resposta de fase aguda é mediada por uma complexa cascata de citocinas, liberadas por células ativadas durante a resposta inflamatória. Esses elementos são representados por proteínas e enzimas no soro, plasma e fluído tecidual, que participam como efetoras da resposta imune inata, denominadas proteínas de fase aguda (PFA). Embora carreguem funções altamente específicas em nível molecular, PFA geralmente reconhecem alvos ou substratos encontrados principalmente na parede celular de grande variedade de microorganismos, normalmente ausentes no ser humano, como os peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, mananas e glicolípides de micobactérias. Essas proteínas são

capazes, pois, de fornecer proteção inespecífica, por reconhecerem imediatamente grande número de patógenos como estranhos, mesmo no primeiro contato ^(59,60).

A maioria das PFA é encontrada em baixas concentrações séricas em condições normais, podendo, no entanto, aumentar mais de mil vezes durante infecções graves, o que expressa sua importância como elementos da resposta de fase aguda do soro ^(59,60).

Durante a reação inflamatória, monócitos secretam citocinas como IL-6, IL-1 e TNF- α que, liberadas localmente, ou na corrente sanguínea, induzem os hepatócitos a sintetizar PFA ^(59,60). São exemplos dessas substâncias α_1 -glicoproteína ácida (GPA), haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e proteína C-reativa (PCR), produzidas em quantidade elevada no fígado ^(61,62).

A expressão de PFA é ainda modulada por hormônios, como os glicocorticóides, que podem estimular diretamente a produção de algumas dessas proteínas. No entanto, seu principal meio de ação é em sinergia com citocinas e fatores de crescimento, como o TGF- β , que potencializa o efeito da IL-6 sobre alguns genes de PFA, possivelmente estimulando a expressão do receptor de IL-6 ^(61,62).

A demonstração desses marcadores no soro pode fornecer ajuda valiosa para a detecção do processo infeccioso, ou avaliação da gravidade e do prognóstico das doenças crônicas ^(40,41). As PFA podem ser detectadas pela eletroforese de proteínas séricas (EFP) ⁽⁶³⁾.

Assim sendo, os níveis de GPA estão elevados nos processos inflamatórios agudos e crônicos, neoplasias, após traumas ou cirurgias e durante a gravidez ou terapia com estrógeno. A síntese dessa proteína é realizada basicamente pelo fígado, mas também pode ocorrer em leucócitos e células tumorais. Como é filtrada em grande quantidade nos glomérulos, tem meia-vida curta, de cerca de cinco dias, o que a torna um dos melhores marcadores de atividade inflamatória, uma vez que seus níveis voltam rapidamente a valores normais ^(61,62,64). Recentemente, demonstrou-se que sua produção pode ser influenciada também pela IL-8 e pelo ácido retinóico. Outra importante fração é a das gamaglobulinas, representada pelas imunoglobulinas, especialmente IgG, que aumenta em doenças inflamatórias crônicas, como a tuberculose ⁽⁶³⁾.

A PCR, considerada uma das provas mais sensíveis e que se apresenta precocemente alterada nos processos inflamatórios, é utilizada rotineiramente para monitorar a resposta de fase aguda. Apresenta meia-vida curta, de 8 horas a 12 horas e níveis extremamente baixos, menores que 0,5 mg/dL que, em resposta a estímulos inflamatórios, elevam-se rapidamente, atingindo, em menos de 24 horas, concentrações até cem vezes maiores que a normal e, na ausência do estímulo crônico, retornam aos níveis basais em três a quatro dias. Sua concentração plasmática fornece dados valiosos para determinar a presença, extensão e atividade do processo inflamatório, assim como para monitorar a evolução e a resposta terapêutica. Sua determinação se faz por imunonefelometria que, por meio da

utilização de anticorpos monoclonais anti-PCR, permite a obtenção de resultados quantitativos (mg/dL), que auxiliam na interpretação clínica e no acompanhamento laboratorial do paciente ^(61,62,65).

O aumento na síntese de PFA é acompanhado pela diminuição das proteínas denominadas de fase aguda negativas, como a albumina, cujos valores diminuem na presença de citocinas inflamatórias ⁽⁶¹⁾.

Outro método tradicional para a monitoração de processos inflamatórios é a velocidade de hemossedimentação (VHS), que depende da carga elétrica na superfície das hemácias e sofre aceleração com o aumento da concentração de fibrinogênio no plasma, durante a resposta de fase aguda. Esse método vem sendo suplantado pela quantificação direta de fibrinogênio sérico ou proteína C-reativa, ambos mais sensíveis e precisos que a resposta de fase aguda ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

5. Justificativa do Estudo

Ainda nos dias de hoje, é muito alto o número de indivíduos que sofre pela ação do *M. tuberculosis*, no Brasil e no mundo. Uma vez vencida a etapa do diagnóstico, é importante o acompanhamento médico do doente em tratamento, até a obtenção da cura. Isso porque a longa duração do tratamento muitas vezes leva ao seu abandono o que, além de trazer prejuízos imediatos para o paciente, ainda constitui um dos fatores causais do aparecimento de cepas multirresistentes do bacilo. Além disso, como o diagnóstico da forma pulmonar da doença é feito, na maioria das vezes, apenas pela baciloscopia, e não pelo cultivo da micobactéria, é raro que se conheça, antes do início do tratamento, a susceptibilidade do bacilo às drogas do esquema antituberculose. Na prática clínica, a pesquisa de atividade inflamatória da tuberculose, desde o momento do diagnóstico até o final do tratamento, é feita por PFA que, embora não sejam marcadores específicos, têm níveis séricos iniciais altos, que vão diminuindo até valores normais quando há resposta ao tratamento. Como se sabe, a produção dessas proteínas é comandada pela atividade imune contra o bacilo, que está presente em quantidade maciça antes do tratamento. Assim, são esperados níveis de PFA comparáveis aos das citocinas, agentes dessa atividade imune e determinantes da resposta de fase aguda, como IFN- γ , TNF- α TGF- β e IL-10. Outro marcador que parece ter utilidade para indicar atividade inflamatória na tuberculose é o VEGF pois, além de também ter produção

ligada à imunopatogênese da tuberculose, é facilmente detectado no sangue periférico de doente e seus níveis tendem a diminuir, acompanhando a melhora clínica. Portanto, a comparação entre o comportamento desses marcadores, desde o diagnóstico de tuberculose até o final do tratamento, é assunto de interesse, no caminho da investigação do melhor marcador de atividade inflamatória no doente tuberculoso.

Objetivos

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Em doentes com tuberculose pulmonar:

- Verificar a resposta ao tratamento específico por meio do comportamento evolutivo de VEGF e de marcadores do processo inflamatório e da resposta imune celular;

- Investigar se existe correlação entre os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β no soro e os valores dessas citocinas encontrados em sobrenadante de cultura de células mononucleares e monócitos do sangue periférico.

2. Objetivos específicos

- Verificar a atividade da imunidade celular pela determinação dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares e monócitos do sangue periférico.

-
- Verificar a atividade inflamatória pela determinação sérica de proteínas totais, GPA, PCR e VEGF e do VHS no sangue.

 - Verificar a relação entre os níveis séricos do VEGF com os das citocinas e das provas de fase aguda inflamatória, realizadas no estudo.

Casuística e Métodos

III. CASUÍSTICA e MÉTODOS

1. Casuística

Participaram do estudo 42 doentes com tuberculose pulmonar, atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Saúde de Bauru e no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Além dos pacientes, foram incluídos 20 doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Todos os indivíduos da casuística foram devidamente esclarecidos sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2. Métodos

2.1 Constituição dos grupos:

Foram formados dois grupos de estudo:

Grupo 1 (G1): grupo controle, constituído por 20 indivíduos com resultados sorológicos negativos para HIV-1/2, HTLV-1/2, vírus das hepatites B e C, *Treponema pallidum* e *Trypanossoma cruzi*, doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com média etária de 38,5 anos (24 anos a 56 anos), todos do sexo masculino, sem queixas

clínicas. Desses indivíduos foram obtidas amostras de sangue em um único momento, para se estabelecer o padrão de normalidade das citocinas estudadas.

Grupo 2 (G2): formado por 42 doentes com tuberculose pulmonar, 29 atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Saúde de Bauru e 13 atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Desse total, 35 eram do sexo masculino e sete do sexo feminino, com média etária de 42,3 anos (18 anos a 74 anos). Todos os pacientes atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de Saúde de Bauru realizavam tratamento diretamente observado (DOT) e os 13 pacientes atendidos pelo Serviço de Moléstias Infecciosas de Botucatu da UNESP recebiam o medicamento em Unidades Básicas de Saúde dos municípios dos quais procediam. A cura foi avaliada ao final do tratamento, pelo restabelecimento clínico, pelo resultado negativo da baciloscopia de escarro e/ou por raio-X de pulmão sem sinais de atividade da doença, ocasião em que recebiam alta médica.

Os pacientes incluídos eram atendidos em ambulatório, com idade a partir de 18 anos, de ambos os gêneros, com diagnóstico de tuberculose pulmonar comprovado por baciloscopia ou por cultura de escarro positivas para *M. tuberculosis*, ou com quadro clínico-epidemiológico e exame de imagem compatíveis com tuberculose em atividade. Foram excluídos pacientes com

concomitância de outras doenças granulomatosas em atividade, ou com sorologia positiva para HIV.

No grupo dos doentes, todas as variáveis estudadas foram determinadas em três momentos: **M1** - após o diagnóstico, antes do início do tratamento antituberculose; **M2** - no terceiro mês de tratamento; **M3** - ao final dos seis meses de tratamento.

2.2 Diagnóstico de Tuberculose:

2.2.1 Identificação do bacilo: baciloscopia e cultura

A baciloscopia de escarro foi realizada no momento do diagnóstico pelo Laboratório de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz de Bauru, e pela Seção de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Inicialmente, o material era descontaminado pelo método de Petroff modificado e, em seguida, a amostra era centrifugada e o sedimento obtido utilizado para a realização da cultura e dos esfregaços ocupando 2/3 da lâmina, corados 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⁽¹³⁾. As lâminas coradas foram submetidas à microscopia óptica

em objetiva de imersão, sendo observados de cem a trezentos campos para a pesquisa de bacilos.⁽¹³⁾

2.2.2 Exames de Imagem

Os exames de imagem utilizados na rotina do diagnóstico de tuberculose, como raio-X simples e tomografia computadorizada, foram realizados por indicação médica. Nos pacientes atendidos pelo Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, esses exames foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital das Clínicas. Nos pacientes atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria da Saúde, em Bauru, foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Manoel de Abreu e do Hospital de Base de Bauru.

2.2.3 Exame histopatológico

Em dois pacientes atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, a demonstração do BAAR foi feita pelo Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas, em exame histopatológico de material de biópsia pulmonar. Também foi realizada biópsia de pulmão em um doente atendido no Serviço de Moléstias Infecciosas da Secretaria de

Estado da Saúde de Bauru, sendo o material examinado no Hospital Estadual de Bauru. O exame histopatológico foi necessário, para se estabelecer o diagnóstico de certeza, em pacientes com quadro clínico, epidemiologia e raio-X de pulmão compatíveis com tuberculose, mas com resultados negativos na baciloscopia de escarro.

2.3 Coleta de sangue

A determinação dos níveis de citocinas no soro e em sobrenadante de cultura de células do sangue periférico, bem como de VEGF e das provas inflamatórias, foi realizada em amostras de 20 ml de sangue obtidos da veia do antebraço, sendo observadas as condutas-padrão de antissepsia. Para a cultura de células do sangue periférico e para a realização do VHS, as amostras foram utilizadas imediatamente após a coleta. O sobrenadante da cultura e o soro foram estocados em alíquotas a -80°C até a determinação dos níveis das citocinas e das proteínas de fase aguda.

2.4 Determinação das citocinas.

2.4.1 No soro

A determinação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , presentes no soro desses pacientes, foi realizada em duplicata, pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando *kits* comerciais (R & D Systems), de acordo com as especificações do fabricante, no Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP ⁽⁶¹⁾. De acordo com a técnica, anticorpo monoclonal específico anti-citocina é colocado em contato com o soro a ser testado, e também com os controles positivo e negativo. Para isso, foram utilizadas micro-placas de 96 orifícios, sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada (TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β). A seguir, foram adicionados os soros-teste (diluição 1:2) e dos controles positivo e negativo, que foram então à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse procedimento, foram realizadas quatro lavagens com solução detergente contendo 2-cloroacetamida (0,1%). Esse processo foi repetido até a fase anterior à adição do substrato. Posteriormente, as placas, marcadas com biotina, receberam estreptoavidina ligada à peroxidase. Após o período de incubação, o substrato, formado por peróxido de hidrogênio (0,02%) e tetrametilbenzina (2%), foi adicionado aos orifícios das placas.

A interrupção da reação foi realizada à temperatura ambiente, utilizando-se ácido sulfúrico 1M. Os resultados foram avaliados pela leitura da densidade óptica (DO) em leitor automático de ELISA (*Titertek Multiskan*), em comprimento de onda de 450nm. As concentrações das citocinas, em pg/ml, foram calculadas a partir dos resultados em DO aplicados em curva padrão de citocina recombinante utilizada como controle, sendo 5 pg/ml o valor mínimo detectável pela técnica.

2.4.2 No sobrenadante de cultura celular

A concentração de citocinas foi também determinada sobrenadante da cultura de células mononucleares totais e de monócitos de sangue periférico, conforme procedimento descrito no item 2.4.1.

As células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque⁽⁶⁵⁾. O anel rico em linfócitos e monócitos foi inicialmente lavado com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) por 5 minutos a 200g. Após este período, foi feita uma suspensão celular em meio de cultura RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. USA), 40 ug/ml de gentamicina e 10% de soro fetal bovino inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC), sendo a identificação, a verificação de viabilidade e a contagem realizadas utilizando corante de Turk para células mononucleares totais, (alíquotas de 50ul da suspensão celular

acrescidas de 50µl da solução corante a 5%), e pela incorporação do vermelho neutro (alíquotas de 50µl da suspensão celular incubadas a 37°C, durante 10 minutos, com 0,45ml da solução do corante a 0,02%), para a contagem de monócitos. A seguir, a suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 24 orifícios, com concentração de 2×10^6 /ml. 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 mononucleares totais e monócitos (2×10^6 /ml), foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% de CO₂, na ausência ou presença de 8µg/ml de fito-hemaglutinina (PHA) e 20µg/ml de lipopolissacáride (LPS), respectivamente. Para a determinação do IFN- γ , foi utilizado o sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e para a determinação de TNF- α , IL-10 e TGF- β , foi utilizado o sobrenadante de monócitos do sangue periférico. Após 24 horas, os sobrenadantes foram aspirados, e alíquotas desse material foram conservadas a -80°C, até o momento de sua utilização na dosagem das citocinas

2.5 Determinação de VEGF

A concentração de VEGF foi determinada em duplicata, no soro dos pacientes com tuberculose em atividade, através da técnica de ELISA, utilizando *kit* comercial (*R&D Systems*), de acordo com as especificações do fabricante, no Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de

Botucatu - UNESP. Por essa técnica são determinadas as isoformas solúveis de VEGF, não se observando reação cruzada com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), nem com outras citocinas homólogas. A sensibilidade de detecção é de 9 pg/ml (0.2 pM) para o VEGF. Os resultados foram avaliados pela leitura da densidade óptica (DO) em leitor automático de ELISA (*Titertek Multiskan*), em comprimento de onda de 450nm. As concentrações de VEGF foram expressas em pg/ml.

2.6 Determinação das proteínas de fase aguda e do VHS

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

A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi determinada no Instituto de Pesquisa “Lauro de Souza Lima” de Bauru e no Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, utilizando-se o método de *Westergreen*.

2.7 Análise estatística

No grupo controle (G1), as variáveis citocinas foram anotadas em um único momento e esses valores foram utilizados como padrão de normalidade. Em G2, as variáveis foram anotadas em três momentos; M1- antes; M2- aos três meses de tratamento antituberculose, M3 – ao final do tratamento antituberculose. As variáveis consideradas neste estudo foram arranjadas nos seguintes agrupamentos:

- 1. resposta inflamatória no sangue periférico:** velocidade de hemossedimentação, proteínas totais, albumina, α 1-glicoproteína ácida, e proteína C-reativa;
- 2. citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monocitos do sangue periférico:** IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β ;
- 3. citocinas séricas:** IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β .
- 4. fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no soro.**

Para alcançar os objetivos do trabalho, foram consideradas a correlação entre as variáveis dos quatro agrupamentos analisados e a comparação dos resultados, apresentados em medianas e quartís, obtidos ao longo do tempo nos doentes sob tratamento. Para verificar a existência de associação entre os valores séricos das citocinas com aqueles determinados no sobrenadante de cultura de células

mononucleares e monócitos do sangue periférico dos doentes, em cada momento, no decorrer do tratamento, foi utilizada a correlação não paramétrica de *Spearman*.

Para avaliar o efeito do tratamento, foi utilizado o teste de *Wilcoxon* para amostras dependentes. Esse teste foi aplicado para os valores obtidos no soro, no sobrenadante de cultura de células mononucleares e monócitos do sangue periférico sem e com estímulo e também para os valores obtidos nas provas de fase aguda. Para isso, para cada variável determinada durante o tratamento, foram comparadas as alterações nos momentos dentro do grupo com tuberculose.

Para comparar as alterações dos valores das citocinas e do VEGF nos momentos em relação ao grupo controle, foi aplicado o teste de *Mann-Whitney*. Para determinar a correlação do VEGF com as citocinas no soro dos doentes, nos momentos, durante o tratamento, foi aplicada a correlação de *Spearman*. O mesmo teste foi aplicado para correlacionar o VEGF com as provas de fase aguda para cada um dos momentos.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (p é a probabilidade de erroneamente se concluir pela significância).

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP tendo sido aprovado em 05 de Dezembro de 2005. (Anexo 1)

Resultados

IV - RESULTADOS

Os resultados do estudo são apresentados a seguir.

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

O Quadro 1 demonstra a caracterização dos 42 doentes com tuberculose pulmonar (G2) quanto ao gênero, idade e método de confirmação diagnóstica. Assim, houve 35 (83,33%) indivíduos do sexo masculino, com média etária de 43,6 anos (20 anos a 77 anos) e sete (16,66%) do sexo feminino, com média etária de 36,4 anos (18 anos a 74 anos).

Em 30 (71,42%), do total de 42 doentes, diagnóstico foi confirmado pela demonstração do agente em baciloscopia de escarro, e ou cultura, e ou material de biópsia e ou por exames de imagem. Desses 30, 27 (64,28%) apresentavam exame de imagem compatível com tuberculose em atividade. Em 10 (23,80%), dos 42 pacientes em que não foi possível evidenciar o agente etiológico, tanto na baciloscopia como na cultura, 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 ao tratamento específico.

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

Pacientes	sexo	idade	Diagnóstico			
			Baciloscopia de escarro	Cultura	Exames de imagem	Outros
1	M	62	pos +		**	
2	F	40	neg		TC	
3	M	52	pos+		TC	
4	M	38	neg		**	TT
5	M	47	pos+		RX	
6	M	70	pos+		RX	
7	M	66	pos+		TC	Biopsia+
8	M	32	**		**	TT
9	F	74	pos+		**	Biopsia+
10	M	48	pos+		RX	
11	M	35	pos+		RX	
12	M	46	pos+		RX	
13	M	77	pos+		RX	
14	F	31	pos (3+)	positiva	RX	
15	M	44	pos (1+)		RX	
16	M	55	pos (3+)	positiva		
17	M	22	pos (1+)		RX	
18	M	38	pos (2+)		RX	
19	M	20	pos (3+)	positiva	RX	
20	M	67			RX	
21	M	60	pos (2+)	positiva	RX	
22	M	47	pos (1+)		RX	
23	M	39	neg		RX	
24	M	27	pos (2+)	positiva		
25	M	39	pos (3+)	positiva		
26	M	41			RX	
27	F	41	pos (2+)		RX	
28	M	42	neg		RX	TT
29	M	50	neg		RX	
30	M	41	neg		RX	TT
31	F	28	pos (1+)		RX	
32	M	35	pos (3+)	positiva		
33	M	49			RX	
34	M	22	pos (3+)	positiva	RX	
35	M	38	pos (1+)		RX	
36	M	45	pos (2+)		RX	
37	M	33	pos (3+)	positiva		
38	M	42	pos (3+)	positiva		
39	M	29	pos (1+)		RX	
40	F	18	pos (1+)	positiva	RX	
41	M	27	pos (3+)	positiva		
42	F	23	pos (3+)	positiva		

M= Masculino; F= Feminino; RX= Raio X; TC= Tomografia computadorizada; TT= Teste terapêutico;
 1+ =menos de 1 BAAR por campo/100 campos; 2+= 1 a 10 BAAR por campo/50 campos; 3+ mais que 10 BAAR por campo/20 campos.
 BAAR= bacilo álcool-ácido resistentes; ** Dados não obtidos.

2. Correlação entre níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , obtidos no soro e no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, com e sem estímulo, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), durante o tratamento.

A Tabela 1 mostra o estudo de correlação entre níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β do soro e do sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, com e sem estímulo, obtidos nos doentes com tuberculose pulmonar, durante o tratamento. Assim, houve correlação positiva e altamente significativa ($p < 0,001$) entre os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , do soro e do sobrenadante de cultura de sangue periférico dos doentes, nos três momentos do estudo: antes do tratamento (M1), no terceiro mês (M2) e ao término do tratamento antituberculose (M3).

Tabela 1 – Correlação entre níveis de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , obtidos no soro e no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, com e sem estímulo, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), durante o tratamento.

Citocinas no soro (pg/ml)		Citocinas em sobrenadante de cultura de células do sangue periférico (pg/ml)					
		TNF- α s/ est (M1)	TNF- α c/est (M1)	TNF- α s/ est (M2)	TNF- α c/est (M2)	TNF- α s/ est (M3)	TNF- α c/est (M3)
TNF- α (M1)	<i>r</i>	0,94	0,84				
	<i>p</i>	0,001	0,001				
TNF- α (M2)	<i>r</i>			0,80	0,74		
	<i>p</i>			0,001	0,001		
TNF- α (M3)	<i>r</i>					0,94	0,84
	<i>p</i>					0,001	0,001
		IFN- γ s/est (M1)	IFN- γ c/est (M1)	IFN- γ s/est (M2)	IFN- γ c/est (M2)	IFN- γ s/est (M3)	IFN- γ c/est (M3)
IFN- γ (M1)	<i>r</i>	0,95	0,91				
	<i>p</i>	0,001	0,001				
IFN- γ (M2)	<i>r</i>			0,96	0,93		
	<i>p</i>			0,001	0,001		
IFN- γ (M3)	<i>r</i>					0,92	0,87
	<i>p</i>					0,001	0,001
		IL-10 s/est (M1)	IL10 c/est (M1)	IL-10 s/est (M2)	IL-10 c/est (M2)	IL-10 s/est (M3)	IL-10 c/est (M3)
IL-10 (M1)	<i>r</i>	0,91	-0,87				
	<i>p</i>	0,001	0,001				
IL-10 (M2)	<i>r</i>			0,91	0,87		
	<i>p</i>			0,001	0,001		
IL-10 (M3)	<i>r</i>					0,82	0,70
	<i>p</i>					0,001	0,001
		TGF- β s/est (M1)	TGF- β c/est (M1)	TGF- β s/est (M2)	TGF- β c/est (M2)	TGF- β s/est (M3)	TGF- β c/est (M3)
TGF- β (M1)	<i>r</i>	0,90	0,76				
	<i>p</i>	0,001	0,001				
TGF- β (M2)	<i>r</i>			0,81	0,73		
	<i>p</i>			0,001	0,001		
TGF- β (M3)	<i>r</i>					0,88	0,71
	<i>p</i>					0,001	0,001

r = estimativa da correlação de Spearman (significativo quando $p < 0,05$).

M1= antes do tratamento; **M2**= três meses após; **M3**= ao final do tratamento; c/ est= com estímulo; s/est= sem estímulo.

3. Efeito do tratamento nos níveis séricos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β e do VEGF nos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

A tabela 2 apresenta os resultados, expressos em medianas e quartis - mediana (1^oQ; 3^oQ), dos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β e do VEGF determinados no soro dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), antes do início do tratamento (M1), aos três meses (M2) e após o tratamento (M3). A comparação entre esses valores mostrou que os níveis séricos das citocinas e do VEGF, antes do início do tratamento, eram significativamente mais elevados do que aqueles obtidos no terceiro mês, atingindo os menores níveis ao final do tratamento: M1>M2>M3 ($p<0,001$).

Dessa forma, as concentrações séricas do TNF- α , antes do tratamento (M1) foram significativamente mais altas que as obtidas aos três meses de tratamento (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 396,0 pg/ml (283,5; 519,0); 286,0 pg/ml (211,5; 394,5); 185,0 pg/ml (109,5; 218,0); $p<0,001$. Em relação ao IFN- γ , as concentrações séricas iniciais (M1) apresentaram níveis bastante altos, diminuindo significativamente no terceiro mês (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 536,0 pg/ml (328,0; 698,0); 320,0 pg/ml (228,5; 610,5); 204,0 pg/ml (183,0; 325,5); $p<0,001$. O mesmo pôde ser observado em relação à IL-10 que, no início (M1), tinha concentrações séricas altas, com diminuição significativa

no meio (M2) e no final (M3) do tratamento, respectivamente: 46,0 pg/ml (30,5; 65,0); 31,0pg/ml (20,0; 44,0) e 18,0 pg/ml (10,0; 30,0); $p < 0,001$. Ainda, os níveis de TGF- β foram maiores antes do tratamento (M1) do que após três meses (M2) e ao final (M3) da terapia antituberculose, respectivamente: 492,0 pg/ml (396,0; 595,5); 346,0 pg/ml (280,0; 417,5); 226,0 pg/ml (183,5; 318,0); $p < 0,001$. Em relação ao VEGF, as concentrações obtidas antes do tratamento (M1) foram significativamente maiores que aqueles observados no terceiro mês (M2) e ao final do tratamento (M3) respectivamente: 612,5 pg/ml (449,2; 816,5); 408,5 pg/ml (315,0; 551,7); 227,0 pg/ml (181,7; 371,2); $p < 0,001$. Os níveis séricos de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β e VEGF de cada indivíduo de G1 e G2, nos três momentos encontram-se nos Apêndices 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2 – Efeito do tratamento nos níveis séricos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β e do VEGF em pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

<i>Citocinas</i> (pg/ml)	<i>momentos</i>	<i>n</i>	<i>Mediana (1^oQ ; 3^oQ)</i>	<i>p</i>
TNF- α	M1	25	396,0 (283,5 ; 519,0)	
TNF- α	M2	25	286,0 (211,5 ; 394,5)	< 0,001 ⁽¹⁾
TNF- α	M3	25	185,0 (109,5 ; 218,0)	< 0,001 ⁽²⁾
IFN- γ	M1	25	536,0 (328,0 ; 698,0)	
IFN- γ	M2	25	320,0 (228,5 ; 610,5)	< 0,001 ⁽¹⁾
IFN- γ	M3	25	204,0 (183,0 ; 325,5)	< 0,001 ⁽²⁾
IL-10	M1	25	46,0 (30,5 ; 65,0)	
IL-10	M2	25	31,0 (20,0 ; 44,0)	< 0,001 ⁽¹⁾
IL-10	M3	25	18,0 (10,0 ; 30,0)	< 0,001 ⁽²⁾
TGF- β	M1	25	492,0 (396,0 ; 595,5)	
TGF- β	M2	25	346,0 (280,0 ; 417,5)	< 0,001 ⁽¹⁾
TGF- β	M3	25	226,0 (183,5 ; 318,0)	< 0,001 ⁽²⁾
VEGF	M1	20	612,5 (449,2 ; 816,5)	
VEGF	M2	20	408,5 (315,0 ; 551,7)	< 0,001 ⁽¹⁾
VEGF	M3	20	227,0 (181,7 ; 371,2)	< 0,001 ⁽²⁾

p = Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (significativo quando p<0,05).

(1) Comparação entre M2 e M1.

(2) Comparação entre M3 e M1.

M1= antes do tratamento; **M2**= três meses após; **M3**= ao final do tratamento.

4. Efeito do tratamento nos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, sem estímulo, nos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

A tabela 3 apresenta os resultados, expressos em medianas e quartís - mediana (1^oQ; 3^oQ), dos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β determinados no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, dos doentes com tuberculose pulmonar (G2), antes do início do tratamento (M1), aos três meses (M2) e após o tratamento (M3). A comparação entre esses valores mostrou que os níveis das citocinas obtidas no sobrenadante de cultura, sem estímulo, antes do tratamento, eram significativamente mais elevados do que aqueles obtidos no terceiro mês, atingindo os menores valores ao final do tratamento (M1>M2>M3); p<0,001.

Dessa forma, as concentrações de TNF- α , em sobrenadante de cultura, sem estímulo, em M1, foram significativamente mais altas que as obtidas aos três meses de tratamento (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 467,0 pg/ml (318,0; 610,2); 307,0 pg/ml (242,2; 415,5); 193,5 pg/ml (120,2; 282,7); p<0,001. Em relação ao IFN- γ , as concentrações iniciais (M1), no sobrenadante de cultura sem estímulo, apresentaram níveis bastante altos, diminuindo significativamente no

terceiro mês (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 535,0 pg/ml (361,0; 725,7); 398,0 pg/ml (252,2; 642,7); 265,0 pg/ml (204,0; 401,0); $p < 0,001$. O mesmo pôde ser observado em relação à IL-10 que, no início (M1), tinha concentrações séricas altas, com diminuição significativa no meio (M2) e no final (M3) do tratamento, respectivamente: 51,0 pg/ml (42,7; 79,2); 41,5 pg/ml (26,7; 60,2); 24,0 pg/ml (11,2; 39,2) $p < 0,001$. Ainda, os níveis de TGF- β foram significativamente maiores antes do tratamento (M1) que após três meses (M2) e ao final (M3) da terapia antituberculose, respectivamente: 620,0 pg/ml (517,2; 792,5); 423,5 pg/ml (354,7; 645,0); 296,0 pg/ml (222,5; 398,5); $p < 0,001$. Os níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β obtidos no sobrenadante de cultura, sem estímulo, para todos os indivíduos nos dois grupos estudados nesta pesquisa encontram-se nos Apêndices 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3 – Efeito do tratamento nos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, sem estímulo, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

<i>Citocinas</i> (pg/ml)	<i>momentos</i>	<i>n</i>	<i>Mediana (1^oQ ; 3^oQ)</i>	<i>p</i>
TNF- α	M1	24	467,0 (318,0 ; 610,2)	
TNF- α	M2	24	307,0 (242,2 ; 415,5)	< 0,001 ⁽¹⁾
TNF- α	M3	24	193,5 (120,2 ; 282,7)	< 0,001 ⁽²⁾
IFN- γ	M1	24	535,0 (361,0 ; 725,7)	
IFN- γ	M2	24	398,0 (252,2 ; 642,7)	< 0,001 ⁽¹⁾
IFN- γ	M3	24	265,0 (204,0 ; 401,0)	< 0,001 ⁽²⁾
IL-10	M1	24	51,0 (42,7 ; 79,2)	
IL-10	M2	24	41,5 (26,7 ; 60,2)	< 0,001 ⁽¹⁾
IL-10	M3	24	24,0 (11,2 ; 39,2)	< 0,001 ⁽²⁾
TGF- β	M1	24	620,0 (517,2 ; 792,5)	
TGF- β	M2	24	423,5 (354,7 ; 645,0)	< 0,001 ⁽¹⁾
TGF- β	M3	24	296,0 (222,5 ; 398,5)	< 0,001 ⁽²⁾

p = Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (significativo quando $p < 0,05$).

(1) Comparação entre M2 e M1.

(2) Comparação entre M3 e M1.

M1= antes do tratamento; **M2**= três meses após; **M3**= ao final do tratamento.

5. Efeito do tratamento nos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico em presença de estímulo, nos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

A tabela 4 apresenta os resultados, expressos em medianas e quartís - mediana (1^oQ; 3^oQ), dos níveis das citocinas determinadas no sobrenadante de cultura de células mononucleares e dos monócitos do sangue periférico, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), em presença de estímulo, antes do início do tratamento (M1), aos três meses (M2) e após o tratamento (M3). A comparação entre esses momentos mostrou que os níveis séricos das citocinas, antes do início do tratamento, eram significativamente mais elevados do que aqueles obtidos no terceiro mês, atingindo os menores níveis ao final do tratamento: M1>M2>M3 (p<0,001).

Assim, as concentrações de TNF- α , obtidas no sobrenadante de cultura de células, com estímulo, antes do tratamento (M1) foram mais altas que as obtidas aos três meses (M2) e ao final do tratamento antituberculose (M3), respectivamente: 582,0 pg/ml (447,2; 800,0); 421,5 pg/ml (327,2; 587,7); 243,5 pg/ml (201,7; 487,0); p<0,001. Em relação ao IFN- γ , as concentrações iniciais (M1) apresentaram níveis ainda mais altos, diminuindo significativamente no terceiro mês (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 668,5 pg/ml (442,7; 86520); 499,5 pg/ml (319,5;

758,0); 360,5 pg/ml (246,5; 545,7); $p < 0,001$. O mesmo pôde ser observado em relação à IL-10 que, no início (M1), tinha concentrações altas, com diminuição significativa no meio (M2) e no final (M3) do tratamento, respectivamente: 76,5 pg/ml (62,7; 92,5); 58,0 pg/ml (35,5; 75,0); 40,0 pg/ml (21,0; 61,0); $p < 0,001$. Em relação ao TGF- β , antes do tratamento (M1), as concentrações obtidas foram significativamente maiores que aquelas observados no terceiro mês (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 817,0 pg/ml (721,0; 942,0); 646,0 pg/ml (517,0; 863,0); 440,0 pg/ml (330,0; 522,0); $p < 0,001$. Os níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , obtidos no sobrenadante de cultura para todos os indivíduos, nos dois grupos estudados nesta pesquisa, encontram-se nos Apêndices 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Efeito do tratamento nos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico em presença de estímulo, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

<i>Citocinas (pg/ml)</i>	<i>momentos</i>	<i>n</i>	<i>Mediana (1^oQ ; 3^oQ)</i>	<i>p</i>
TNF- α	M1	24	582,0 (447,2 ; 800,0)	
TNF- α	M2	24	421,5 (327,2 ; 587,7)	< 0,001 ⁽¹⁾
TNF- α	M3	24	243,5 (201,7 ; 487,0)	< 0,001 ⁽²⁾
IFN- γ	M1	24	668,5 (442,7 ; 865,2)	
IFN- γ	M2	24	499,5 (319,5 ; 758,0)	< 0,001 ⁽¹⁾
IFN- γ	M3	24	360,5 (246,5 ; 545,7)	< 0,001 ⁽²⁾
IL-10	M1	24	76,5 (62,7 ; 92,5)	
IL-10	M2	24	58,0 (35,5 ; 75,0)	< 0,001 ⁽¹⁾
IL-10	M3	24	40,0 (21,0 ; 61,0)	< 0,001 ⁽²⁾
TGF- β	M1	23	817,0 (721,0 ; 942,0)	
TGF- β	M2	23	646,0 (517,0 ; 863,0)	< 0,001 ⁽¹⁾
TGF- β	M3	23	440,0 (330,0 ; 522,0)	< 0,001 ⁽²⁾

p = Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (significativo quando p<0,05).

(1) Comparação entre M2 e M1.

(2) Comparação entre M3 e M1.

M1= antes do tratamento; **M2**= três meses após; **M3**= ao final do tratamento.

6. Efeito do tratamento nos valores de VHS e nos níveis das proteínas de fase aguda, alfa-1 glicoproteína ácida, proteína C-reativa, proteínas totais, globulina e albumina, determinadas nos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

Embora os valores da α 1-glicoproteína ácida e do VHS variem conforme o gênero, não foi observada, neste estudo, diferença significativa entre pacientes dos sexos masculino e feminino. A tabela 5 apresenta os resultados, expressos em medianas e quartis: mediana (1ºQ; 3ºQ), dos valores obtidos para o VHS no sangue total e da α 1-glicoproteína ácida, proteína C-reativa, proteínas totais, globulina e albumina, determinadas no soro dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), antes do início do tratamento (M1), aos três meses (M2) e após o tratamento (M3).

Antes do início do tratamento (M1), os valores obtidos para VHS foram mais elevados do que os do terceiro mês (M2), atingindo os menores níveis ao final do tratamento (M3), respectivamente: 51,0 mm/h (22,2; 77,0); 14,5 mm/h (9,1; 32,2) e ao final do tratamento (M3) 10,7 (5,0; 23,0). Dessa forma $M1 > M2 > M3$ ($p < 0,001$). Esses resultados acham-se expressos na Tabela 5 e Figura 1.

As concentrações séricas da α 1-glicoproteína ácida dos doentes, antes do tratamento (M1), embora dentro dos valores normais de referência, foram mais altas do que as obtidas aos três meses de tratamento (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 116,0 mg/dl (87,0; 162,7); 63,4 mg/dl (43,9; 99,0); 53,9 mg/dl

(40,7; 77,0). Assim, $M1 > M2$ ($p < 0,003$) e $M1 > M3$ ($p < 0,001$). No entanto não houve diferença em relação aos valores de referência (Tabela 5; Figura 2).

Em relação à PCR, as concentrações séricas iniciais (M1), apresentaram níveis bastante altos, que foram diminuindo significativamente no terceiro mês (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 3,5g/dl (0,9; 6,6); 0,7g/dl (0,3; 1,6); 0,1g/dl (0; 0,4). Desse modo, $M1 > M2 > M3$ ($p < 0,001$), (Tabela 5; Figura 3).

A comparação entre os valores obtidos para as proteínas totais mostrou queda significativa apenas entre antes (M1) e três meses após o tratamento (M2), respectivamente: 8,0g/dl (7,4; 8,4); 7,5g/dl (7,1; 7,8), não havendo diferença estatística entre M1 e ao final do tratamento (M3): 7,8g/dl (7,3; 8,1). Desse modo, $M1 > M2$ ($p = 0,012$) e entre M1 e M3 ($p > 0,05$). No entanto, também não houve diferença em relação aos valores de referência (Tabela 5; Figura 4).

As concentrações séricas iniciais (M1), das globulinas nos doentes (G2), embora pouco acima dos valores de referência, apresentaram diminuição significativa aos três meses (M2) e ao final do tratamento (M3), respectivamente: 3,9g/dl (3,5; 4,4); 3,4g/dl (3,1; 4,0); 3,4g/dl (3,3; 3,8). Assim, $M1 > M2$ ($p = 0,012$) e $M1 > M3$ ($p = 0,008$). No entanto, ainda aqui, não houve diferença em relação aos valores de referência (Tabela 5; Figura 5).

Em relação à concentração de albumina sérica, não houve diferença entre os valores des antes (M1), aos três meses (M2) e ao final do tratamento (M3) ($p > 0,05$).

Mais uma vez, não houve diferença entre esses valores e os de referência (Tabela 5; Figura 6).

Todos os valores, dos doentes desse estudo e normais de referência, de VHS e das proteínas de fase aguda: α 1-glicoproteína ácida, proteína-C reativa, proteínas totais, globulina e albumina, encontram-se nos Apêndices 7,8,9,10,11,12.

Tabela 5 – Avaliação do efeito do tratamento, sobre os valores de VHS e das proteínas de fase aguda alfa-1 glicoproteína ácida, proteína-C reativa, proteínas totais, globulina e albumina, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2).

Resposta de fase		momentos		
aguda		n	Mediana (1^oQ ; 3^oQ)	p
VHS (mm/h)	M1	20	51,0 (22,2 ; 77,0)	
VHS (mm/h)	M2	20	14,5 (9,1 ; 32,2)	< 0,001 ⁽¹⁾
VHS (mm/h)	M3	20	10,7 (5,0 ; 23,0)	< 0,001 ⁽²⁾
α1-GPA (mg/dl)	M1	21	116,0 (87,0 ; 162,7)	
α1-GPA (mg/dl)	M2	21	63,4 (43,9 ; 99,0)	0,003 ⁽¹⁾
α1-GPA (mg/dl)	M3	21	53,9 (40,7 ; 77,0)	< 0,001 ⁽²⁾
PCR (mg/dl)	M1	21	3,5 (0,9 ; 6,6)	
PCR (mg/dl)	M2	21	0,7 (0,3 ; 1,6)	< 0,001 ⁽¹⁾
PCR (mg/dl)	M3	21	0,1 (0 ; 0,4)	< 0,001 ⁽²⁾
PT (g/dl)	M1	22	8,0 (7,4 ; 8,4)	
PT (g/dl)	M2	22	7,5 (7,1 ; 7,8)	0,012 ⁽¹⁾
PT (g/dl)	M3	22	7,8 (7,3 ; 8,1)	0,242 ⁽²⁾
Globulina (g/dl)	M1	22	3,9 (3,5 ; 4,4)	
Globulina (g/dl)	M2	22	3,4 (3,1 ; 4,0)	0,012 ⁽¹⁾
Globulina (g/dl)	M3	22	3,4 (3,3 ; 3,8)	0,008 ⁽²⁾
Albumina (g/dl)	M1	22	4,0 (3,4 ; 4,6)	
Albumina (g/dl)	M2	22	4,2 (3,7 ; 4,4)	0,128 ⁽¹⁾
Albumina (g/dl)	M3	22	4,3 (3,8 ; 4,5)	0,553 ⁽²⁾

p = Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (significativo quando p<0,05).

(1) Comparação entre M2 e M1.

(2) Comparação entre M3 e M1.

M1= antes do tratamento; **M2**= três meses após; **M3**= ao final do tratamento.

VHS=velocidade de hemossedimentação. *Valores de referência*: homens (até 10mm/h); mulheres (até 20 mm/h)

alfa1- GPA= alfa1-glicoproteína ácida. *Valores de referência*: homens (50mg/dl a 130 mg/dl); mulheres (40mg/dl a 120 mg/dl). **PCR**= proteína-C reativa. *Valores de referência*: (≤1,00 mg/dl); **PT**= proteínas totais. *Valores de referência*: (6,3 g/dl a 8,2 g/dl); **Globulina**; *Valores de referência*: (2,8 g/dl a 3,2 g/dl). **Albumina**; *Valores de referência*: (3,5 g/dl a 5,0 g/dl).

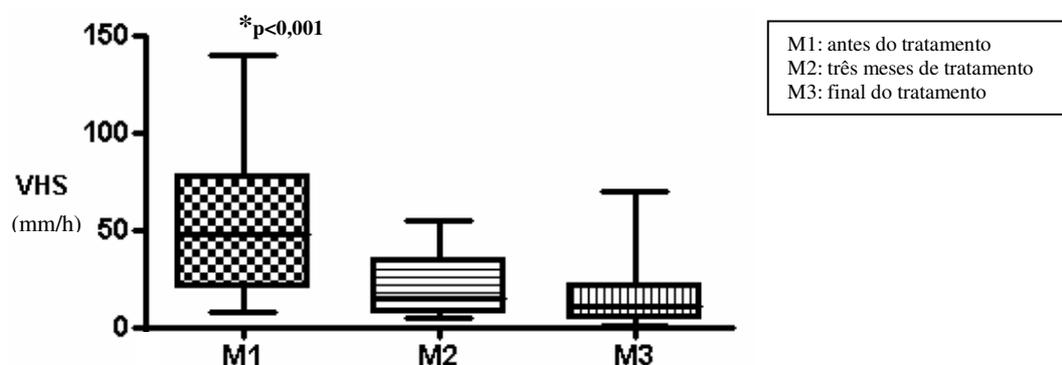


Figura 1. Comparação entre os valores em medianas e quartis de VHS, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento (M1> M2> M3). Valores de referência: homens (até 10mm/h); mulheres (até 20 mm/h).

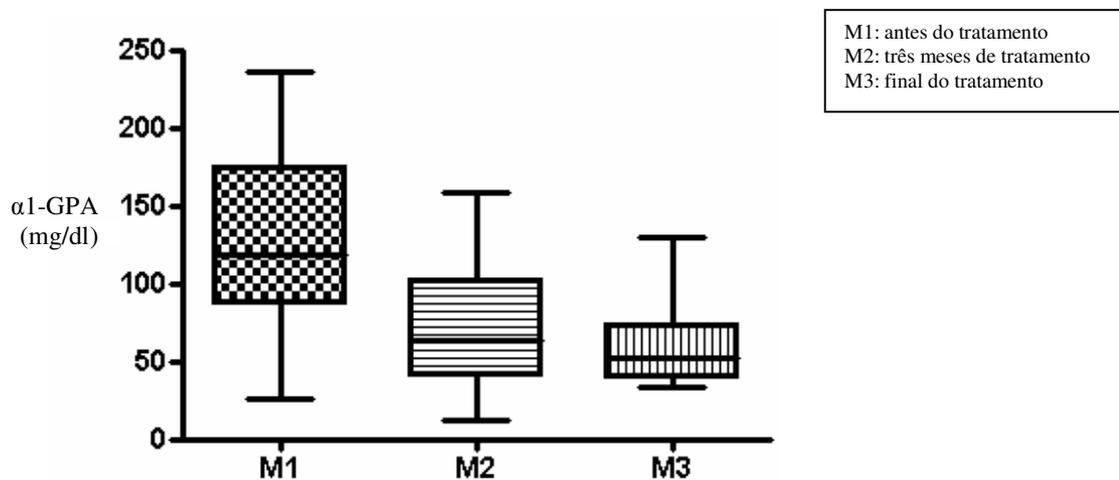


Figura 2. Comparação entre os valores em medianas e quartis de $\alpha 1$ -GPA, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento (M1> M2> M3). Valores de referência: homens (50mg/dl a 130 mg/dl); mulheres (40mg/dl a 120 mg/dl).

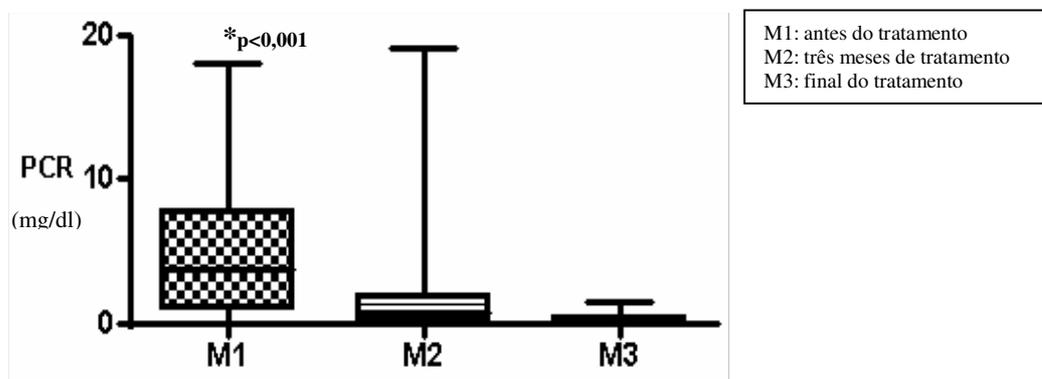


Figura 3. Comparação entre os valores em mdianas e quartis de PCR, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento (M1> M2> M3). Valores de referência: ($\leq 1,00$ mg/dl).

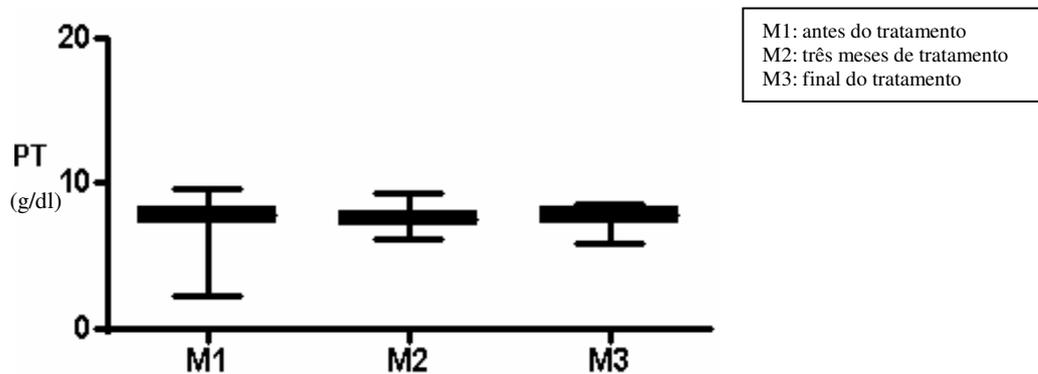


Figura 4. Comparação entre os valores em medianas e quartis de PT, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento (M1> M2 = M3). Valores de referência: (6,3 g/dl a 8,2 g/dl)

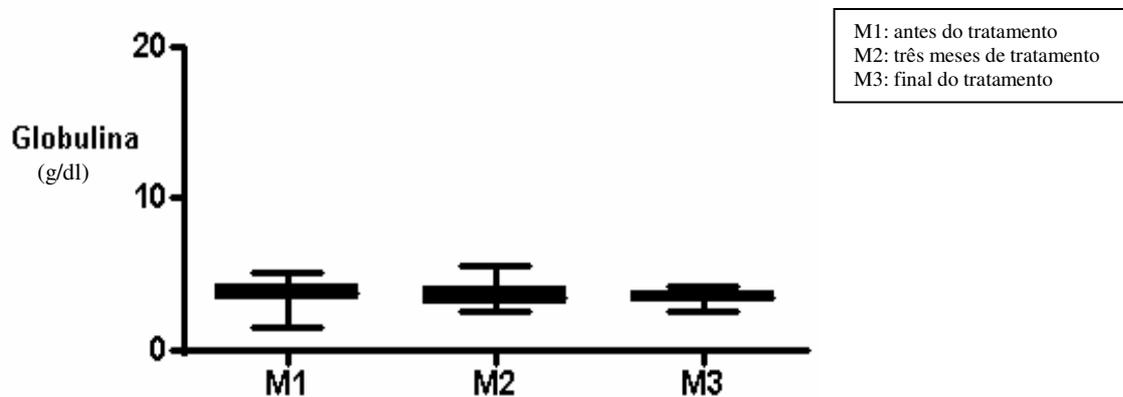


Figura 5. Comparação entre os valores em medianas e quartis de globulina, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento ($M1 > M2 = M3$). Valores de referência: (2,8 g/dl a 3,2 g/dl).

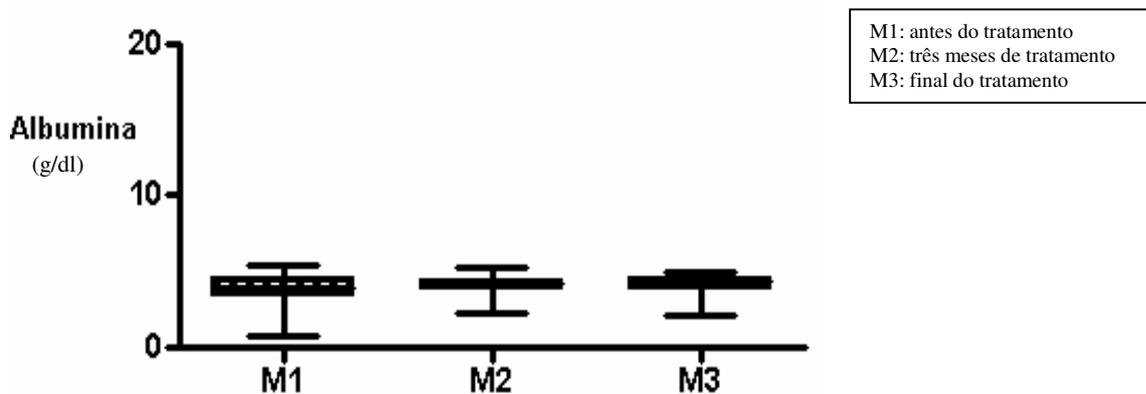


Figura 6. Comparação entre os valores em medianas e quartis de albumina, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento ($M1 = M2 = M3$). Valores de referência: (3,5 g/dl a 5,0 g/dl).

7. Comparação entre os valores de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , no soro e em sobrenadante de cultura celular e de VEGF, no soro, apresentados pelo grupo de doentes com tuberculose pulmonar antes, aos 3 e 6 meses de tratamento em relação ao grupo controle.

A tabela 6 mostra a comparação entre os níveis de VEGF, obtidos no soro, e o das citocinas, no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares totais e monócitos do sangue periférico, com e sem estímulo, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), com os valores das mesmas substâncias medidas no grupo controle (G1), apresentados em mediana e quartís: mediana (1^oQ; 3^oQ). Nessa comparação, foram utilizados os valores dos doentes obtidos aos três meses (M2) e ao final do tratamento (M3). Nas Figuras 7, 8, 9,10 e 11 encontra-se a comparação dos valores séricos de VEGF e de cada uma das citocinas, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , dos doentes antes (M1), aos três meses (M2) e ao final do tratamento (M3), com os valores do grupo controle.

A análise dos dados demonstrou que os níveis séricos de todas as citocinas estudadas, assim como os níveis séricos do VEGF, foram mais elevados no grupo com tuberculose (G2), no terceiro mês de tratamento (M2), quando comparados ao grupo controle (G1): $G2 > G1$ ($p < 0,001$).

Desse modo, em M2, para TNF- α : no soro, foram encontrados níveis de 306,5pg/ml (218,2; 386,2) para G2 e de 103,0 pg/ml (82,0; 120,0), para G1; em sobrenadante de cultura, sem estímulo, foram encontrados níveis de 346,0 pg/ml (250,2; 420,0) para G2 e de 120,5 pg/ml (102,0; 150,2), para G1: em sobrenadante de cultura, com estímulo, foram encontrados níveis de 435,0 pg/ml (380,2; 602,7) para G2 e, para G1, de 205,0 pg/ml (139,7; 244,7). Em M2, para o IFN- γ : no soro, valores de 400,5pg/ml (238,5; 600,5) para G2, e de 207,0pg/ml (151,2; 256,5), para G1; em sobrenadante de cultura, sem estímulo, G2 com 405,5 pg/ml (254,0; 665,0) e G1, com foram 247,0 pg/ml (204,5; 292,0); em sobrenadante de cultura, com estímulo, G2 com níveis de 502,5 pg/ml (304,0; 795,0) e G1, com 304,0 pg/ml (292,2; 368,2). Em M2, para IL-10: no soro: níveis de G2 de 32,5pg/ml (20,0; 50,0) e de G1, de 4,5 pg/ml (0,0; 10,0); em sobrenadante de cultura, sem estímulo, G2 com 44,0 pg/ml (31,0; 61,2) e G1 com 6,5 pg/ml (10,0; 15,0); em sobrenadante de cultura, com estímulo, níveis de G2 de 61,5 pg/ml (45,5; 77,2) e de G1, de 15,0 pg/ml (10,0; 20,7). Em M2, para o TGF- β : no soro, valores de 384,5pg/ml (305,2; 474,0) para G2 e de 129,0 pg/ml (106,2; 180,7), para G1; em sobrenadante de cultura, sem estímulo, valores de G2 de 480,0 pg/ml (387,0; 637,0) e, de G1, de 182,0 pg/ml (130,5; 223,5); em sobrenadante, com estímulo, valores de 680,0 pg/ml (558,5; 843,0) para G2 e de 462,5 pg/ml (381,5; 573,0), para G1. Finalmente, em M2, para o VEGF: no soro, os níveis séricos de G2 foram 416,0 pg/ml (315,0; 589,0) e os de G1, de 187,0 pg/ml (122,2; 268,0).

Quando foram comparados os valores das citocinas e VEGF obtidos nos doentes (G2) ao final do tratamento (M3), com os níveis dessas substâncias encontrados no grupo controle, não houve homogeneidade dos resultados. Assim, em M3, para TNF- α : no soro, os níveis séricos de G2 foram de 178,0 pg/ml (108,7; 212,7) e os de G1, de 103,0 pg/ml (82,0; 120,0); em sobrenadante de cultura, sem estímulo, os níveis séricos de G2 foram 198,0 pg/ml (120,2; 282,7) e de G1 foram 120,5 pg/ml (102,0; 150,2); em sobrenadante de cultura, com estímulo, G2 teve níveis de 273,5 pg/ml (201,7; 487,0) e G1, de 205,0 pg/ml (139,7; 244,7). Em M3, para IFN- γ : no soro, valores para G2 de 205,5pg/ml (181,5; 327,7) e para G1, de 207,0pg/ml (151,2; 256,5); em sobrenadante de cultura, sem estímulo, valores de G2 de 265,0 pg/ml (204,5; 411,0) e de G1, de 247,0 pg/ml (204,5; 292,0); em sobrenadante de cultura, com estímulo, valores de G2 foram 360,5 pg/ml (246,5; 560,5) e de G1 foram 304,0 pg/ml (292,2; 368,2). Em M3, para IL-10: no soro, níveis de G2 foram 18,0pg/ml (10,0; 29,0) e de G1 foram 4,5 pg/ml (0,0; 10,0); em sobrenadante de cultura, sem estímulo, níveis de G2, foram 28,0 pg/ml (15,2; 39,2) e de G1 foram 6,5 pg/ml (10,0; 15,0); em sobrenadante de cultura, com estímulo, níveis de G2 foram 44,0 pg/ml (21,0; 60,7) e de G1 foram 15,0 pg/ml (10,0; 20,7). Em M3, para TGF- β : no soro, G2 teve níveis de 228,5 pg/ml (191,2; 313,0) e G1, de 129,0 pg/ml (106,2; 180,7); em sobrenadante de cultura, sem estímulo, G2 teve níveis de 303,0 pg/ml (233,5; 417,5) e G1, de 182,0 pg/ml (130,5; 223,5); em sobrenadante de cultura, com estímulo, G2 teve níveis de 474,5 pg/ml (339,5; 545,2)

e G1, de 462,5 pg/ml (381,5; 573,0). Finalmente, para VEGF, em M3: no soro, os níveis séricos de G2 foram 240,0 pg/ml (181,0; 363,0) e os de G1, 187,0 pg/ml (122,2; 268,0).

Assim, em M3, em relação ao TNF- α , os valores de G2 foram mais altos que os de G1 em todos os tipos de amostra: soro ($p < 0,001$); sobrenadante de cultura, sem estímulo ($p = 0,002$) e com estímulo ($p = 0,014$). Para IFN- γ , os valores de G2 ao final do tratamento estavam dentro dos limites da normalidade (G1), tanto no soro, como no sobrenadante de cultura, com e sem estímulo ($p > 0,05$). A comparação dos níveis de IL-10 de G2, ao final do tratamento, com os de G1, mostrou diferença significativa para todos os tipos de amostras ($p < 0,001$). Em relação ao TGF- β , em G2, ao final do tratamento, os níveis ainda eram maiores que G1 no soro e na cultura sem estímulo ($p < 0,001$); no entanto, não houve diferença, entre G1 e G2, quanto aos níveis de TGF- β encontrados na cultura de células, com estímulo ($p > 0,05$). Em relação ao VEGF, em M3, os valores séricos permaneciam maiores que os de G1, embora tenha havido queda dos níveis ao longo do tratamento ($p = 0,024$).

Tabela 6 – Comparação entre os valores de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , no soro e em sobrenadante de cultura celular e de VEGF, no soro, do grupo de doentes com tuberculose pulmonar aos 3 e 6 meses de tratamento, em relação aos valores do grupo controle.

<i>Citocina</i>									
<i>(pg/ml)</i>	<i>Amostra</i>	<i>n</i>	<i>G 1</i>	<i>n</i>	<i>G2 (M2)</i>	<i>p⁽¹⁾</i>	<i>n</i>	<i>G2 (M3)</i>	<i>p⁽²⁾</i>
TNF-α	Soro	20	103,0(82,0 ; 120,0)	36	306,5(218,2 ; 386,2)	<0,001	28	178,0(108,7 ; 212,7)	<0,001
	Sem estímulo	20	120,5(102,0 ; 150,2)	36	346,0(250,2 ; 420,0)	<0,001	28	198,0(120,2 ; 282,7)	0,002
	Com estímulo	20	205,0(139,7 ; 244,7)	36	435,0(380,2 ; 602,7)	<0,001	28	273,5(201,7 ; 487,0)	0,014
IFN-γ	Soro	20	207,0(151,2 ; 256,5)	36	400,5(238,5 ; 600,5)	<0,001	28	205,5(181,5 ; 327,7)	0,217
	Sem estímulo	20	247,0(204,5 ; 292,0)	34	405,5(254,0 ; 665,0)	<0,001	28	265,0(204,5 ; 411,0)	0,336
	Com estímulo	20	304,0(292,2 ; 368,2)	34	502,5(304,0 ; 795,0)	0,001	28	360,5(246,5 ; 560,5)	0,310
IL10	Soro	20	4,5(0,0 ; 10,0)	36	32,5(20,0 ; 50,0)	<0,001	28	18,0(10,0 ; 29,0)	<0,001
	Sem estímulo	20	6,5(10,0 ; 15,0)	34	44,0(31,0 ; 61,2)	<0,001	28	28,0(15,2 ; 39,2)	<0,001
	Com estímulo	20	15,0(10,0 ; 20,7)	34	61,5(45,5 ; 77,2)	<0,001	28	44,0(21,0 ; 60,7)	<0,001
TGF-β	Soro	20	129,0(106,2 ; 180,7)	36	384,5(305,2 ; 474,0)	<0,001	28	228,5(191,2 ; 313,0)	<0,001
	Sem estímulo	20	182,0(130,5 ; 223,5)	34	480,0(387,0 ; 637,0)	<0,001	29	303,0(233,5 ; 417,5)	<0,001
	Com estímulo	20	462,5(381,5 ; 573,0)	33	680,0(558,5 ; 843,0)	<0,001	28	474,5(339,5 ; 545,2)	0,851
VEGF	Soro	20	187,0(122,2 ; 268,0)	32	416,0(315,0 ; 589,0)	<0,001	23	240,0(181,0 ; 363,0)	0,024

G1= Grupo controle

G2= Pacientes com tuberculose pulmonar

M2= aos três meses de tratamento

M3= ao final do tratamento

(1) Comparação dos pacientes de tuberculose (G2) em M2 com os controles (G1), pelo teste de Mann-Whitney. Resumo descritivo em mediana e quartís.

(2) Comparação dos pacientes de tuberculose (G2) em M3 com os controles (G1), pelo teste de Mann-Whitney. Resumo descritivo em mediana e quartís.

n= tamanho amostral

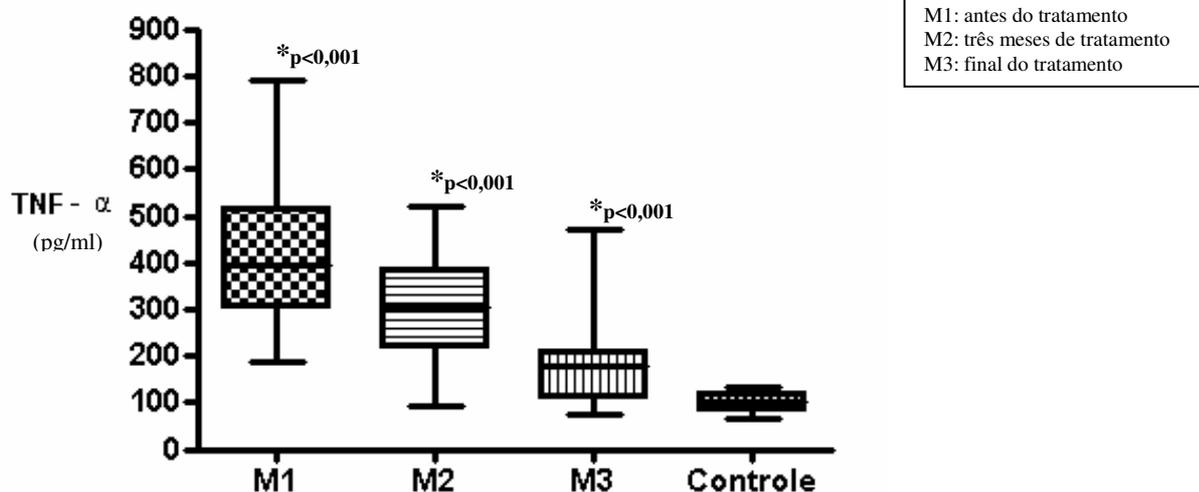


Figura 7. Comparação entre os valores séricos de TNF- α em medianas e quartis, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento e o grupo controle (G1). M1>M2>M3; M1,M2,M3 > G1 ($p<0,001$).

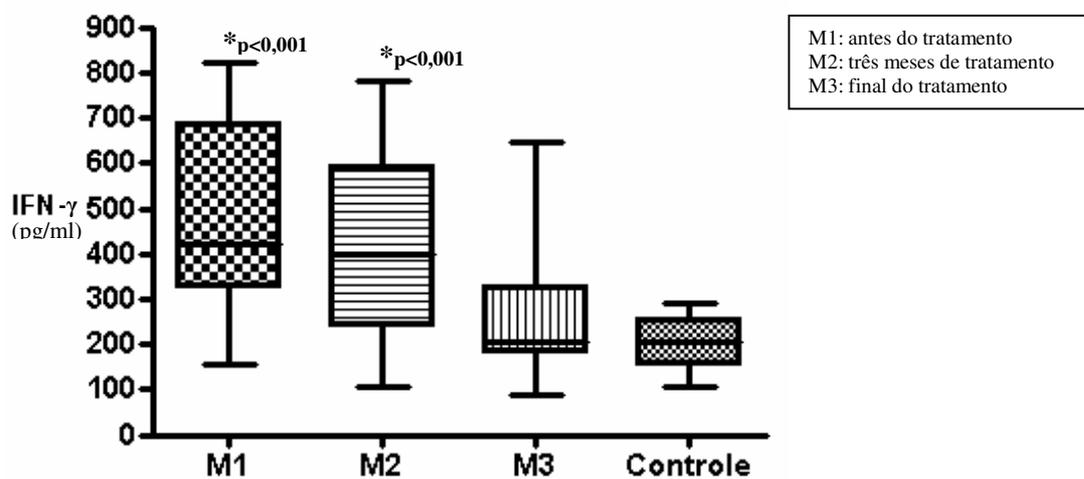


Figura 8. Comparação entre os valores séricos de IFN- γ em medianas e quartis, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento e o grupo controle (G1). M1>M2>M3; M1,M2 > G1; M3 = G1.

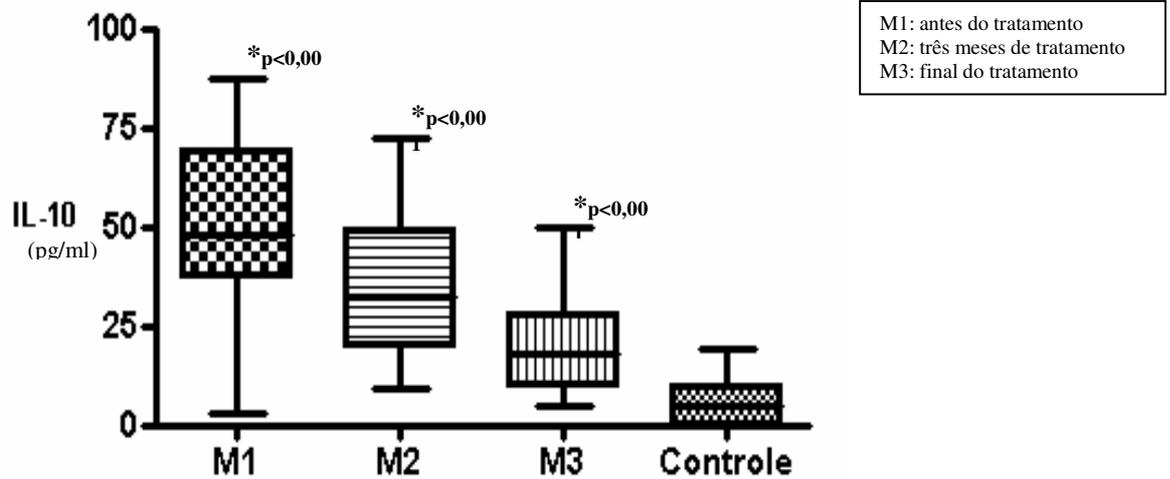


Figura 9. Comparação entre os valores séricos de IL-10 em medianas e quartis, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento e o grupo controle (G1). $M1 > M2 > M3$; $M1, M2, M3 > G1$.

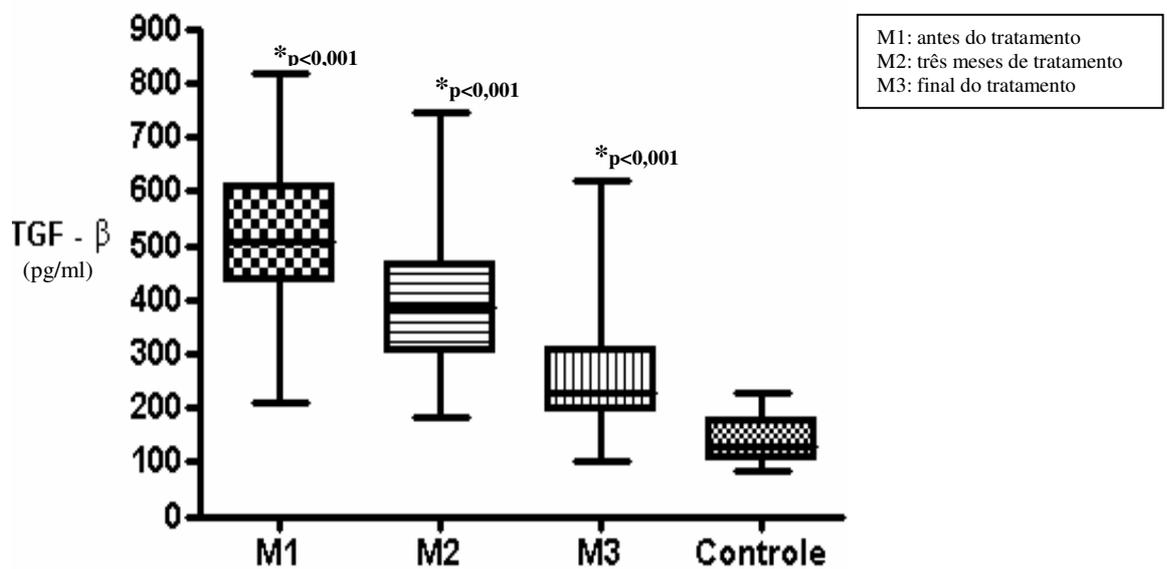


Figura 10. Comparação entre os valores séricos de TGF- β em medianas e quartis, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento e o grupo controle (G1). $M1 > M2 > M3$; $M1, M2, M3 > G1$.

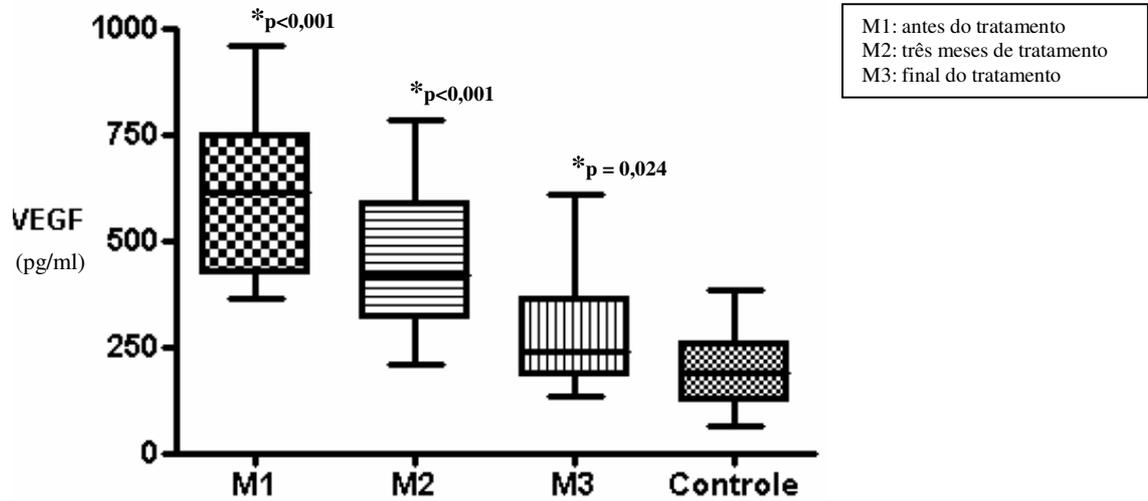


Figura 11. Comparação entre os valores séricos de VEGF em medianas e quartis, no grupo com tuberculose pulmonar durante o tratamento e o grupo controle (G1). $M1 > M2 > M3$; $M1, M2, M3 > G1$.

8. Correlação entre os níveis de VEGF e das citocinas no soro dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), em M1, M2 e M3.

A tabela 7 apresenta os resultados de correlação entre os níveis séricos de VEGF e das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar antes, no terceiro mês e ao final do tratamento.

Observou-se correlação fortemente positiva entre os valores de VEGF e de TNF- α , antes (M1), após três meses (M2) e ao final do tratamento (M3) ($p < 0,001$). Em relação aos níveis séricos de IFN- γ e VEGF, observou-se correlação negativa, não significativa ($p > 0,05$), em M1 e M2. Foi observada ainda correlação positiva entre os valores de VEGF e IL-10, porém com significância estatística ($p < 0,001$), apenas ao final do tratamento (M3).

Correlação positiva significativa também foi observada entre os níveis séricos de VEGF e TGF- β em M1 ($p < 0,001$) e em M2 e M3 ($p < 0,01$).

Tabela 7 – Correlação entre os níveis de VEGF e citocinas, determinados no soro, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), em M1, M2 e M3.

<i>VEGF no soro</i> <i>(pg/ml)</i>	<i>Citocinas no soro (pg/ml)</i>											
	<i>TNF-α</i>			<i>IFN-γ</i>			<i>IL-10</i>			<i>TGF-β</i>		
	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>
<i>VEGF (M1)</i>	<i>r</i>	0,63			-0,30			0,26			0,46	
<i>VEGF (M1)</i>	<i>p</i>	0,001			0,07			0,11			0,001	
<i>VEGF (M2)</i>	<i>r</i>		0,49			-0,07			0,31			0,47
<i>VEGF (M2)</i>	<i>p</i>		0,001			0,71			0,08			0,01
<i>VEGF (M3)</i>	<i>r</i>			0,64			0,28			0,63		0,50
<i>VEGF (M3)</i>	<i>p</i>			0,001			0,19			0,001		0,01

r = estimativa da correlação de Spearman

p = valor de p (significativo quando $p \leq 0,05$)

M1= antes do tratamento; M2= após três meses; M3= ao final do tratamento.

9. Correlação entre os níveis séricos de VEGF e os resultados das provas de fase aguda, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), em M1, M2 e M3.

A Tabela 8 apresenta os resultados da correlação entre os níveis séricos de VEGF e dos marcadores inflamatórios: VHS, α 1-GPA, PCR, PT, globulina e albumina dos doentes (G2) antes do tratamento (M1), três meses após (M2) e ao final do tratamento (M3). Correlação positiva ($p < 0,05$) foi observada apenas entre VEGF e PCR, aos três meses de tratamento (M2). Nos demais momentos, não houve correlação significativa entre os valores dessas duas variáveis ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Correlação entre os níveis de VEGF determinados no soro, com os valores das provas de fase aguda, dos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), em M1, M2 e M3.

VEGF no soro (pg/ml)		Provas de fase aguda																	
		VHS(mm/h)			AGA(mg/dl)			PCR(g/dl)			PT(g/dl)			Albumina (g/dl)			Globulina(g/dl)		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
VEGF (M1)	<i>r</i>	0,05			0,10			0,03			0,08			0,12					0,001
VEGF (M1)	<i>p</i>	0,77			0,55			0,85			0,65			0,47					0,98
VEGF (M2)	<i>r</i>		0,09			0,21			0,38*			0,16			0,22				0,04
VEGF (M2)	<i>p</i>		0,67			0,25			0,03			0,40			0,23				0,83
VEGF (M3)	<i>r</i>				0,15			0,16			0,21			0,19				0,09	0,29
VEGF (M3)	<i>p</i>				0,53			0,48			0,35			0,41				0,70	0,19

r = estimativa da correlação de Spearman

p = valor de p (significativo quando p≤0,05)

M1= antes do tratamento; M2= após três meses; M3= ao final do tratamento.

Discussão

V - DISCUSSÃO

A tuberculose permanece, ainda nos dias de hoje, como um dos mais sérios problemas de saúde pública, apesar dos esforços de programas visando melhorar o diagnóstico e o tratamento ^(1,16,17).

Em sua forma pulmonar, contagiosa, a tuberculose causa por ano, no mundo, cerca de três milhões de óbitos, em torno de cinco mortes por minuto⁽¹⁷⁾. A cada ano, oito milhões de novos casos de tuberculose são diagnosticados no mundo e estima-se que um terço da população mundial (dois bilhões de pessoas) esteja infectada com o bacilo na sua forma latente ^(2,3,67).

Outro dado alarmante é o aumento considerável de cepas MDR e, mais recentemente, XDR. Em 2003, estimava-se que 458.000 novos casos de tuberculose por cepa MDR ocorrendo no mundo em 2003, constituindo 3,2% do total de casos novos de tuberculose ⁽¹⁰⁾. Em consequência disso e de outros fatores, como a pandemia HIV/aids e a alta incidência da tuberculose no sistema prisional, o número de doentes volta a preocupar os órgãos de saúde. Além desses fatores, a demora para se chegar ao diagnóstico e o abandono do tratamento colaboram com a rápida emergência de resistência as drogas.^(1,4,8) Considere-se, ainda, a dificuldade de seguimento desses pacientes durante o tratamento, que representa um obstáculo para o controle e a identificação das falhas terapêuticas ^(1,4,8).

Países subdesenvolvidos e em desenvolvimento têm a maior incidência da doença, com grande envolvimento do sexo masculino, na faixa etária produtiva, que favorece maior número de contatos e afasta esses indivíduos do trabalho, originando prejuízo para a economia do país ^(2,3,67).

No presente estudo, também foi alta a incidência da doença no sexo masculino, com idades entre 20 e 49 anos, faixa que representa 75% dos casos descritos em adultos, pelos diferentes trabalhos sobre o assunto ^(2,3,67). Esses resultados podem ser explicados, em parte, pelas diferenças biológicas, epidemiológicas e de comportamento relacionadas ao gênero, como resposta imune, oportunidade de exposição ao *M. tuberculosis*, ligada às atividades profissionais e menor cuidado com a saúde, verificado entre os indivíduos do sexo masculino ^(68,69).

A identificação dos casos contagiosos é o primeiro passo para o controle da tuberculose. O início imediato do tratamento da forma pulmonar não só beneficia o paciente, mas, também, proporciona o controle da doença na comunidade ⁽⁷⁰⁾. No entanto, muitas vezes, diante de um resultado de baciloscopia negativo, o diagnóstico é empírico, baseado em sintomas ⁽⁷⁰⁾.

O elevado índice de positividade nas provas bacteriológicas para *M.tuberculosis* do grupo de doentes desse estudo, certamente tem relação com o fato de a casuística ter sido selecionada entre indivíduos que já tinham o diagnóstico de infecção pelo bacilo firmado.

A infecção com *M. tuberculosis* resulta em doença ativa em apenas 5% a 10% dos indivíduos expostos, sendo que a grande maioria controla efetivamente a infecção. Isso pode ser explicado pelas diferenças individuais de suscetibilidade às doenças, que sofre influência de diversos fatores. Por exemplo, a resposta imune celular, particularmente do tipo Th1, contém as infecções por patógenos intracelulares, como é o caso da tuberculose. Contribuem para isso as citocinas que atuam, inicialmente, por meio da imunidade inata e, mais tarde, pela imunidade adaptativa, cuja ação controla a infecção crônica ^(16,17,71).

A determinação dos níveis séricos (e plasmáticos) das citocinas sofre influência do momento em que se colhe a amostra, da ligação dessas substâncias com seus receptores, da degradação por ação da temperatura e da excreção urinária. No entanto, a escolha dessa via leva em conta a facilidade de acesso às amostras, uma vez que a obtenção de clones de células para a cultura requer técnica mais sofisticada e trabalhosa, que dificulta sua utilização na rotina ^(18,72).

Segundo Jason *et al* ⁽¹⁸⁾, a medida de citocinas no soro fornece resultados estatisticamente significantes, embora varie conforme a doença ou o estado clínico do paciente. No estudo que avaliou a relação existente dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de células de sangue periférico com aqueles no soro do paciente com infecções sistêmicas, como sepsis, malária, infecção crônica pelo HIV, esses autores observaram maior correlação com IL-10, IFN- γ e IL-2. Essa correlação

variou conforme a presença ou ausência do agente infeccioso no sangue, sendo a mais forte encontrada para os indivíduos HIV-positivo ⁽¹⁸⁾.

No presente estudo, nos doentes com tuberculose pulmonar, os níveis das citocinas no soro, apesar de mais baixos, também mostraram forte correlação com os obtidos em sobrenadante de cultura. No entanto, em ambas as situações, os valores estavam bastante acima das concentrações observadas no grupo controle. Esse comportamento foi observado tanto em relação às citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , quanto às antiinflamatórias IL-10 e TGF- β , repetindo-se em cada um dos momentos do estudo: antes do início, no terceiro mês e ao final do tratamento antituberculose. Esses resultados sugerem que, embora não represente medida precisa da produção celular, a dosagem de citocinas no soro, pode ser um método útil para se aferir a presença dessas substâncias nas diferentes fases da evolução de quadros infecciosos como a tuberculose e, assim, avaliar o curso da doença, do ponto de vista imunopatológico ^(18,72).

Entre os fatores que dificultam o controle da tuberculose, deve ser lembrada a longa duração do tratamento e a falta de marcadores capazes de indicar, precocemente, a resposta à terapêutica específica ^(73,74). O principal recurso, utilizado atualmente para esse fim, têm sido a baciloscopia e a cultura de escarro. Esta última, embora mais específica, não pode ser considerada ideal, pelo longo tempo de espera, cerca de seis semanas, até que se obtenha o resultado. Dessa forma, a cura muitas vezes é baseada somente nos aspectos clínicos, radiológicos e em resultado negativo

de exame bacteriológico ^(70,73-75). Já, na prática clínica, geralmente a monitorização da resposta ao tratamento é feita pelas provas inflamatórias de fase aguda que, embora não específicas, e na falta de melhor marcador, auxiliam na determinação da presença, ou ausência, da atividade da doença ^(60,57,58). Vale lembrar, ainda, que, em algumas situações, torna-se necessária a realização do teste de sensibilidade às drogas cujo resultado, demorado, pode favorecer o aumento de casos de tuberculose por bacilo MDR ⁽⁷⁶⁾. Assim, a procura por bons marcadores, capazes de indicar supressão do processo inflamatório pelo tratamento, continua sendo muito importante.

Vários estudos apontam o papel das citocinas, no processo infeccioso, como marcadores de atividade da tuberculose ou de resposta ao tratamento específico ⁽⁷⁷⁻⁸³⁾. Ribeiro-Rodrigues *et al* ⁽⁷³⁾, 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 pulmonar, por meio da avaliação dessas 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, 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 ⁽⁷³⁾.

Sahiratmadja *et al* ⁽⁷⁷⁾, verificaram a capacidade de produção de TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico, estimuladas com

antígeno sonicado de *M. tuberculosis*, LPS e PHA, de doentes com tuberculose, durante o tratamento, fazendo correlação com a atividade da doença. Esses autores encontraram níveis de TNF- α significativamente mais elevados que os controles, antes do tratamento. Esses níveis caíram após dois meses de terapia específica, e atingiram valores próximos aos do controle, ao final do tratamento. Observaram ainda que LPS induziu produção significativamente maior de TNF- α que o antígeno específico. Outros estudos demonstraram elevada produção de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico de pacientes estimuladas com *M. tuberculosis* quando comparadas ao controle^(83,84). Olobo *et al*⁽⁷⁸⁾, observaram níveis elevados de IL-10, seguidos pelos de TGF- β e TNF- α , em líquido pleural e também no plasma de pacientes com tuberculose pleural. Verificaram, ainda, aumento dessas citocinas no plasma de contactantes saudáveis. Outros estudos demonstram aumento do risco de reativação da infecção latente por tuberculose com o uso de terapia anti-TNF- α ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾. Da mesma forma, pacientes com artrite reumatóide, tratados com anticorpo anti-TNF- α , uma forma de conter o processo inflamatório auto-agressivo, apresentam reativação da tuberculose⁽⁸⁵⁾.

Vários estudos, além desses já citados, evidenciam o papel essencial do TNF- α na defesa inicial do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*, sendo sua rápida produção fundamental para limitar a multiplicação da micobactéria e controlar a evolução da tuberculose no hospedeiro^(35,77,78,83,84,86,87).

No presente estudo, os pacientes com tuberculose apresentaram níveis de TNF- α significativamente mais elevados que os do grupo controle, antes do início, aos três meses e ao final do tratamento, quer quando medidos em sobrenadante de cultura de monócitos do sangue periférico dos pacientes, quer no soro. Durante o acompanhamento desses doentes, os níveis da citocina foram diminuindo de maneira significativa, sendo menores que os encontrados no momento inicial aos três meses e ao final do tratamento antituberculose, tanto no soro, quanto no sobrenadante de cultura de células mononucleares. Em seu trabalho com pacientes com tuberculose pulmonar em atividade, Deveci *et al* ⁽⁸⁸⁾ também notaram diminuição gradativa e significativa dos níveis de TNF- α após dois, quatro e seis meses de tratamento.

Os níveis elevados de TNF- α , observados nos doentes tuberculosos do presente estudo, podem ser explicados pelo seu importante papel, em ação paralela à atividade das citocinas do perfil Th1, no controle da fase inicial, inflamatória, da infecção pelo *M. tuberculosis* ^(35,77). Essa ação pró-inflamatória inicial do TNF- α , se faz pelo estímulo da expressão de moléculas de adesão (MCP-1), de quimiocinas (IL-8) e de seus receptores, que resulta no recrutamento de macrófagos para o local da lesão tuberculosa, os quais, em associação com a IL-2, contribuem para a formação do granuloma funcional no tecido infectado, que contém a infecção, e impede a multiplicação bacilar. Com isso há restrição da infecção e prevenção da disseminação ^(16,17,37,38).

Na tuberculose, sabe-se que, na ausência de TNF- α , ou de seu receptor, os granulomas formados não são bem organizados, têm poucos macrófagos ativados e o arranjo dos linfócitos está alterado, o que torna sua atividade deficiente. Nesse sentido, experimentos com camundongos infectados por *M. tuberculosis* e deficientes para produção de TNF- α , e de seu receptor, mostraram formação desorganizada do granuloma e processo inflamatório exacerbado nesses animais, o que sugere o papel central dessa citocina no controle da doença⁽⁴⁹⁾. Ainda, a neutralização de TNF- α em camundongos com forma latente de tuberculose resultou na reativação da multiplicação bacilar⁽³⁷⁾. Esses dados, todos, dão evidências do envolvimento do TNF- α , *in vivo*, com a formação e manutenção da lesão granulomatosa que contém o avanço do bacilo^(17,21,35,85,89).

Por outro lado, o TNF- α também pode ser um fator importante de deterioração clínica do tuberculoso, sendo mesmo citado como o principal responsável pela destruição do tecido pulmonar do indivíduo infectado⁽⁴⁶⁾. Isso aconteceria pela capacidade reduzida do macrófago de destruir o *M. tuberculosis*, o que leva a um recrutamento contínuo de células inflamatórias ao local da lesão e conseqüente necrose do tecido pulmonar⁽³⁸⁾. Há estudos que relacionam o aumento de deterioração clínica e da mortalidade, no início do tratamento de tuberculose grave, à grande concentração de níveis dessa citocina^(36,89). Assim, o TNF- α tem efeito pró-inflamatório e papel crítico na imunomodulação do mecanismo de defesa

contra o bacilo, responsável pelo delicado equilíbrio entre a imunidade protetora e a fisiopatológica^(16,17,89).

O IFN- γ é outra citocina cuja produção no início da infecção é crítica para o controle do *M. tuberculosis*⁽²¹⁾. Embora não atue isoladamente, tem papel fundamental no desenvolvimento da resposta protetora contra infecções por patógenos intracelulares, pois estimula os macrófagos e aumenta sua capacidade microbicida e de síntese de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio^(37,90). Na tuberculose, o IFN- γ está envolvido na formação do granuloma. No entanto, os resultados dos diversos estudos são controversos, pois alguns sugerem que seus níveis estão diminuídos, enquanto outros apontam para seu papel no controle infecção na fase inicial^(17,75,79,88,91-95).

Estudos conduzidos por Sahiratmadja *et al*⁽⁷⁷⁾, demonstraram haver correlação inversa dos níveis de IFN- γ com a atividade da doença. Segundo esses autores, ocorre forte diminuição na concentração dessa citocina no sobrenadante de cultura de células de sangue periférico, durante a tuberculose em atividade, que volta a aumentar no decorrer do tratamento. Mostraram ainda que, na cultura de células estimuladas pelo antígeno sonicado da micobactéria, a produção de IFN- γ foi mais alta nas formas moderada ou branda da doença do que na forma mais avançada. Por outro lado, quando as células foram estimuladas por mitógeno inespecífico (PHA), que mede a capacidade geral da célula T em produzir citocinas, não encontraram

alteração na produção de IFN- γ durante o tratamento, o que sugere relação antígeno-específica reversível nessa diminuição.

Outros estudos demonstram que, no momento do diagnóstico da tuberculose, a concentração de IFN- γ é mais elevada no sítio da lesão do que no sangue periférico. Desse modo, no lavado bronco-alveolar de pacientes com tuberculose avançada seus níveis são altos e, após tratamento bem sucedido, verifica-se queda significativa dos níveis da citocina ^(89,94). Ribeiro-Rodrigues *et al* ⁽⁷³⁾ relatam que a concentração do IFN- γ , no escarro de doentes com tuberculose, é significativamente mais elevada que em indivíduos saudáveis, ou com outras pneumonias bacterianas. Também no escarro, os níveis de IFN- γ diminuem rapidamente após a quimioterapia, quando a baciloscopia tem resultado negativo ⁽⁹⁴⁾. O mesmo pode ser verificado no líquido do derrame da tuberculose pericárdica ⁽⁹³⁾. Esses achados sugerem de maneira importante que, durante a atividade da tuberculose, há uma compartimentalização dos linfócitos específicos contra o antígeno micobacteriano no local da infecção, e que essas células podem aparecer no sangue periférico após a quimioterapia. Assim, pode-se dizer que as concentrações do IFN- γ no soro, durante a doença ativa, são mais baixas do que no sítio da lesão e, após o tratamento, os níveis séricos aumentam significativamente, coincidindo com a chegada dos linfócitos ao sangue periférico, no período pós-quimioterapia ⁽⁸⁹⁾.

O *M. tuberculosis* pode, também, impedir o macrófago de responder adequadamente ao IFN- γ , como mostra Flynn *et al* ⁽¹⁹⁾, em estudo recente. Do

mesmo modo Koo et al ⁽⁹⁰⁾, observaram, em estudo experimental, que a estimulação do macrófago pelo IFN- γ é inibida pela própria bactéria, viva, e por seus componentes. Assim a estimulação com mitógenos inespecíficos, de células em cultura, é bastante utilizada para determinar a capacidade real da célula em produzir citocinas ^(19,90).

No presente estudo, diferindo dos relatos dos outros autores, não se encontrou diminuição do IFN- γ no sangue periférico, na doença em atividade. Ao contrário, os pacientes apresentaram níveis significativamente aumentados da citocina, antes do tratamento, em relação aos indivíduos normais. Esse comportamento do IFN- γ foi verificado tanto no soro, quanto no sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas totais, estimuladas ou não, na fase ativa da doença, antes do início da terapêutica específica.

Essa discordância entre este estudo e os de outros autores pode estar ligada à fase evolutiva da tuberculose. Enquanto a maioria dos trabalhos abordou a doença avançada, no estudo ora em discussão predominou a forma clínica moderada, em que os doentes são atendidos em ambulatorios, não necessitando de internação hospitalar. Dlugovitzky *et al* ⁽⁹⁶⁾ também observaram níveis significativamente mais elevados de IFN- γ em pacientes com evolução clínica moderada, quando comparados com os doentes com formas mais avançada da doença.

Mas, outros autores também descreveram níveis de IFN- γ elevados na tuberculose pulmonar. Portales-Peres *et al* ⁽⁸⁴⁾ observaram aumento de produção de

IFN- γ por células mononucleares totais do sangue periférico, em pacientes com tuberculose pulmonar crônica, estimuladas com antígeno de *M. tuberculosis*.

Verbon *et al* ⁽⁹⁴⁾ avaliaram amostras de soro de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar durante o tratamento e de dois grupos-controle: contactantes saudáveis e indivíduos normais. Mostraram 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 com os controles. Pacientes após o tratamento, assim como os contactantes, tiveram níveis de IFN- γ iguais aos dos controles normais.

A diminuição da produção de IFN- γ ao longo do tratamento foi verificada por Berktaş *et al* ⁽⁹⁵⁾, em pacientes com tuberculose pulmonar, antes e dois meses após o início do tratamento, sendo os níveis séricos finais significativamente menores que os iniciais. Deveci *et al* ⁽⁸⁸⁾ concordam com esses achados, tendo observado diminuição significativa dos níveis séricos de IFN- γ em indivíduos com tuberculose pulmonar ativa antes, aos dois, quatro e seis meses de tratamento. Os autores, inclusive, sugerem que esse parâmetro poderia ser utilizado como indicador de sucesso terapêutico.

No presente estudo, os pacientes com tuberculose pulmonar apresentavam níveis de IFN- γ no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas totais maiores que os do grupo controle, antes e aos três meses de tratamento, com e sem estímulo pela PHA. Esses níveis tiveram diminuição

significativa, ao longo do tratamento, atingindo concentrações iguais aos dos indivíduos do grupo controle, ao final da terapêutica específica.

Todo o estímulo pró-inflamatório, exercido pelas citocinas até aqui discutidas, tem que ser equilibrado, para a proteção do indivíduo infectado, contra o excesso de resposta de perfil Th1. Assim, à medida que a infecção evolui e o granuloma vai sendo formado, aumenta a expressão de IL-4 e IL-10 e diminui a de IFN- γ , conforme relato de Orme et al ⁽⁴⁰⁾. Porém, há autores que associam o aumento de citocinas representativas do perfil Th2, às formas mais avançadas da doença, enquanto que o predomínio de IFN- γ (perfil Th1), às suas formas leves ⁽⁴¹⁾.

A IL-10, citocina considerada antiinflamatória e reguladora da resposta imune, desativa os macrófagos pela inibição da produção de IL-12, o que leva à redução da produção de IFN- γ pelo linfócito T⁽⁹⁷⁾. Desse modo, essa citocina é considerada elemento essencial para a proteção do hospedeiro contra o excesso de resposta tipo Th1, o que certamente está ocorrendo quando o indivíduo apresenta sinais e sintomas de tuberculose e é feito o diagnóstico etiológico. Todos os doentes da presente pesquisa tiveram os níveis pré-tratamento de IL-10 determinados nessa fase. E, neles, esses níveis foram bem altos em relação aos do grupo normal.

Do mesmo modo, Olobo *et al* ⁽⁷⁸⁾ identificaram altos níveis de IL-10 no plasma de pacientes com tuberculose pulmonar e pleural. Também encontraram níveis aumentados dessa citocina nos contactantes, o que os levou a concluir ser esse um mecanismo modulador da resposta inflamatória contra o bacilo.

Bonecini-Almeida *et al*⁽⁹⁸⁾, avaliando a expressão de citocinas imunorreguladoras no lavado bronco-alveolar, constataram níveis significativamente mais altos de IL-10, bem como expressão aumentada de mRNA dessa citocina, nos pacientes com tuberculose pulmonar em atividade, quando comparados com indivíduos com tuberculose pregressa e com controles normais.

Os níveis de IL-10, produzidos na fase de grande atividade do processo inflamatório, verificada antes do tratamento, são significativamente maiores do que durante ou mesmo após a terapêutica específica. Isso pode ser confirmado por estudos conduzidos por Deveci *et al*⁽⁸⁸⁾, que detectaram concentrações significativamente mais altas de IL-10 no soro de pacientes com tuberculose em atividade do que naqueles com doença pregressa. Notaram, ainda, redução significativa da citocina após quatro meses de tratamento.

Da mesma forma, Verbon *et al*⁽⁹⁴⁾ obtiveram médias mais altas de IL-10 no soro de pacientes com tuberculose em atividade, que diminuía durante a terapia, embora se mantivessem maiores do que os de indivíduos normais.

No presente estudo, também foi demonstrado aumento significativo dos níveis de IL-10 no soro, assim como em sobrenadante de cultura de monócitos do sangue periférico, estimulados ou não com LPS, nos pacientes com tuberculose pulmonar. Esse resultado foi observado antes, durante e ao final do tratamento antituberculose, em comparação com os valores obtidos no grupo controle. Embora tenha havido diminuição na produção de IL-10 ao longo do tratamento, seus níveis

ainda permaneciam significativamente mais elevados do que os do grupo controle, no final da terapêutica específica.

Em estudo conduzido por Sahiratmadja *et al*⁽⁷⁷⁾, em pacientes com tuberculose em atividade, o aumento da produção de IL-10 por células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com LPS, foi pequeno, tendo voltado aos níveis normais, verificados nos controles, ao final da terapia. Essa normalização pode ter acontecido pelos níveis iniciais baixos dessa citocina nos doentes. Ao contrário, no presente estudo, as concentrações séricas de IL-10 dos pacientes, antes do tratamento, foram aproximadamente dez vezes maiores que as do grupo controle e, no sobrenadante de cultura, os valores foram ainda mais altos.

A manutenção de concentrações altas de IL-10, mesmo após o final do tratamento, talvez possa se apoiar em trabalhos como o de Couper *et al*⁽⁹⁹⁾, que estudaram as células T reguladoras (Treg), produzidas no timo, e que têm capacidade para secretar IL-10. Segundo esses autores, essas células estão associadas à manutenção do equilíbrio entre a eliminação do patógeno e a imunopatologia. Na infecção moderada, a produção de IL-10 pelas células dendríticas e pelos macrófagos seria deslocada para as células Treg, resultando em alterações patológicas mais leves, mas permitindo a persistência do bacilo. Nos casos em que há forte resposta inflamatória, com altos níveis de TNF- α e de IFN- γ , como ocorreu no presente estudo, as células Treg, assim como a produção de IL-10,

seriam necessárias, ainda durante a fase de resolução da infecção, para minimizar as alterações patológicas causadas pela inflamação⁽¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾.

A IL-10 estabelece verdadeiro equilíbrio entre a resposta imune protetora e a patológica, uma vez que altos níveis de IFN- γ e TNF- α levam à necrose tecidual^(91,105). Segundo Balcewics-Sablinska *et al*⁽³⁰⁾, a neutralização da ação do TNF- α pela IL-10 é conseguida pela indução da liberação dos receptores solúveis da citocina, TNF- α R2. Assim, seriam formados complexos TNF-TNFR, que controlariam a função nociva do TNF- α . A IL-10 pode atuar, ainda, inibindo diretamente a resposta de células T CD4+^(20,38,90).

No entanto, ao lado de toda essa atividade antiinflamatória, a IL-10 também tem efeito anti-apoptótico, que permite aumento da sobrevivência do macrófago infectado, garantindo um foco de produção contínua das citocinas pró-inflamatórias⁽³⁸⁾. A dualidade da atividade pró- e antiinflamatória da IL-10 é bem demonstrada em experimento com camundongos transgênicos, que apresentam expressão constitutiva de IL-10. Esses animais têm menor capacidade de contenção da infecção pelo Bacilo Calmette-Guérin (BCG), embora não tenham prejuízo da resposta da produção de IFN- γ . Desse modo, a IL-10 atuaria inibindo a ativação do macrófago, promovida pelo IFN- γ ^(20,90). Os resultados de Ribeiro-Rodrigues *et al*⁽⁷³⁾, e os do presente trabalho, em que níveis elevados de IFN- γ e IL-10 foram encontrados, concomitantemente, nos doentes com tuberculose, concordam com esses achados.

A origem da IL-10, no sítio da infecção tuberculosa, parece ser mais do macrófago do que do linfócito Th2 ⁽¹⁰⁶⁾. No entanto, Boussiotis *et al* ⁽¹⁰⁷⁾, em pacientes anérgicos com tuberculose, demonstraram células T produtoras de IL-10. Outro estudo, utilizando marcação intracelular de citocinas, mostrou que células T CD4+ e T CD8+, de pacientes com tuberculose, podem produzir IL-10 quando estimuladas com derivado protéico purificado (PPD) ⁽⁸⁹⁾.

Produtos micobacterianos induzem ainda a produção de TGF- β pelos monócitos e células dendríticas. O TGF- β é produzido em grande quantidade durante a tuberculose em atividade, sendo expresso também no sítio da infecção. Essa citocina suprime a imunidade mediada por células, a produção de IFN- γ e de citocinas pró-inflamatórias ^(16,98,108). Embora seu efeito antiinflamatório seja protetor, níveis excessivamente altos de TGF- β podem impedir a ação de mecanismos imunes contra a tuberculose ^(37,108).

Dlugovitzky *et al* ⁽⁴¹⁾, estimulando *in vitro* células mononucleares periféricas, mostraram níveis de TGF- β , significativamente maiores nos pacientes com tuberculose do que nos controles ⁽⁹⁶⁾. Concordando com esses dados, Fiorenza *et al* ⁽¹⁰⁹⁾, encontraram níveis aumentados de TGF- β e TNF- α na forma grave da doença. Bonecini-Almeida *et al* ⁽⁹⁸⁾ observaram a expressão de altos níveis de TGF- β e de seu receptor, em lavado bronco-alveolar de pacientes com tuberculose ativa, maiores do que naqueles com a forma inativa.

Deveci *et al* ⁽⁸⁸⁾ não observaram diferença nos níveis séricos de TGF- β quando compararam pacientes com tuberculose ativa, inativa e controles, sugerindo que o TGF- β apresente atividade pro-inflamatória em baixas concentrações e antiinflamatória em altas concentrações. Resultados similares obtiveram Olobo *et al* ⁽⁷⁸⁾, que encontraram níveis elevados de TGF- β no plasma, mas indetectáveis de TNF- α em pacientes com tuberculose. De acordo com esses autores, os baixos níveis de TNF- α podem ser devidos ao efeito supressor de TGF- β , aumentado nesses pacientes, e ao fato de estarem na fase avançada da tuberculose.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os trabalhos apresentados, pois doentes com tuberculose tinham níveis significativamente mais elevados de TGF- β , tanto no soro como em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico, estimuladas ou não por LPS, quando comparados aos controles. Esses níveis diminuíram significativamente ao longo do tratamento dos pacientes. No entanto, apesar dessa diminuição, ainda mostravam níveis mais elevados do que os controles, ao final do tratamento. A exceção se verificou nos níveis da citocina encontrados em sobrenadante de cultura de células do sangue periférico, estimuladas com LPS que, ao final do tratamento, não diferiram dos do grupo controle. Esse achado poderia ser indicativo de que as células desses doentes, ao final do tratamento, já estavam produzindo TGF- β na sua capacidade máxima, em função da necessidade da ação reparadora da citocina sobre o tecido afetado. Assim sendo, não puderam responder ao estímulo da LPS.

É bem conhecido o papel do TGF- β no processo de reparação tecidual e fibrose. Além de atuar na formação da cicatriz, agindo em diferentes níveis para aumentar a deposição de colágeno, é quimiotática para fibroblasto, promovendo sua transformação em miofibroblasto e induzindo a síntese de matriz protéica e de glicoproteínas ^(58,88,110-112).

De acordo com Scott-Browne *et al* ⁽¹⁰¹⁾, camundongos infectados com *M. tuberculosis* apresentam grande quantidade de Tregs no interior dos granulomas, inclusive interagindo diretamente com clones de células infectadas. Uma vez que as Tregs antígeno-induzidas ou adaptativas expressam citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e o TGF- β , essa poderia ser a explicação dos altos níveis dessas citocinas apresentados ao final do tratamento, que atuariam com o intuito de conter o processo, bem como de reparar o tecido ⁽¹⁰⁰⁾.

As citocinas pró-inflamatórias, liberadas pelas células ativadas durante a resposta inflamatória, ao longo do processo tuberculoso são responsáveis pela forte resposta de fase aguda, local e sistêmica, acompanhada por inúmeras alterações metabólicas e neuro-endócrinas, clinicamente caracterizadas por febre, anorexia, leucocitose e catabolismo de células musculares. Como resultado de alterações na concentração das proteínas de fase aguda e aumento do VHS, ocorre aumento da viscosidade plasmática ⁽⁶²⁾. Embora denominada “resposta de fase aguda”, esse fenômeno também acompanha a fase crônica do processo inflamatório.

A maioria dos diversos elementos da resposta de fase aguda, como fibrinogênio, PCR e α 1-GPA, tem pouca especificidade diagnóstica. No entanto, esses elementos podem ser importantes para discriminar os processos inflamatórios dos não inflamatórios, bem como para refletir a intensidade da inflamação. O acompanhamento seriado dessas proteínas pode ser indicativo de resolução ou piora do processo infeccioso ⁽⁵⁷⁾.

Lawn *et al* ⁽⁵⁷⁾, avaliando parâmetros de fase aguda em pacientes com tuberculose pulmonar, observaram que a queda nos níveis da PCR e o aumento na concentração de hemoglobina são os primeiros sinais que acompanham a melhora clínica do paciente, enquanto que a volta a valores normais da VHS demanda um tempo maior. Assim, sugerem o uso da PCR e da hemoglobina para o acompanhamento do tratamento, principalmente naqueles casos não confirmados inicialmente ⁽⁵⁷⁾.

Baynes *et al* ⁽¹¹³⁾ demonstraram que, na tuberculose pulmonar, altos níveis de PCR e de VHS apresentavam correlação positiva com a gravidade da doença.

Caner *et al* ⁽¹¹⁴⁾, determinaram os níveis de IL-2 e PCR associando-os aos aspectos clínicos e radiológicos em pacientes com tuberculose pulmonar. Observaram que, enquanto os níveis de IL-2 eram similares aos dos controles, os níveis de PCR eram significativamente mais altos. Sugeriram ainda haver uma correlação positiva da PCR com o diâmetro da cavidade pulmonar, apontando-a como um bom indicador de gravidade da doença.

Unsal *et al* ⁽⁵⁸⁾, observaram aumento na concentração sérica de IL-6 e PCR proporcional à contagem de plaquetas em pacientes com tuberculose pulmonar. Verificaram ainda, nesses pacientes, aumento significativo das PFA em relação aos controles normais.

Sahiratmadja *et al* ⁽⁷⁷⁾, estudando pacientes com tuberculose pulmonar em atividade, antes da introdução do tratamento, constataram 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 parâmetros hematológicos, encontravam-se normais ⁽⁷⁷⁾.

Hernandez-Pando *et al* ⁽³⁷⁾, em modelo experimental de tuberculose, observaram alta expressão de mRNA para α -1GPA e fibrinogênio, associada à baixa expressão de gene para albumina.

No presente estudo, os resultados estão, de modo geral, de acordo com os de outros autores, tendo-se observado aumento significativo de VHS, PCR, e globulina nos doentes com tuberculose pulmonar, antes do tratamento, em relação aos níveis encontrados após três meses e ao final do tratamento. Espera-se, nas infecções crônicas, aumento da concentração das globulinas, com tendência para a diminuição da de albumina. A grande produção das PFA pelo fígado associa-se à diminuição da síntese das proteínas normalmente encontradas no sangue, como pré-albumina, transferrina e albumina, consideradas PFA negativas ⁽⁶¹⁾.

Os resultados obtidos concordam com aqueles que sugerem o uso desses parâmetros de resposta de fase aguda para auxiliar o monitoramento da atividade da tuberculose. É provável que os valores circulantes de PCR na infecção micobacteriana representem o melhor parâmetro, dentre aqueles até aqui discutidos, pelos diferentes trabalhos, para indicar atividade do processo inflamatório. Em seguida, tem-se a VHS, considerada um bom marcador, embora inespecífico, de atividade de doenças subagudas e crônicas. No presente estudo, VHS, α 1-GPA e PCR foram os parâmetros que mais se distanciaram dos valores normais de referência, no início da doença, atingindo mais rapidamente os níveis normais após o tratamento.

Na tuberculose pulmonar, a par da resposta de fase aguda, ainda se verifica um estado de hipercoagulabilidade, ocorrendo trombose venosa profunda, confirmada por métodos laboratoriais, em 3% a 4% desses pacientes. No entanto, em razão da forma subclínica da doença, apresentada pela maioria dos pacientes, a incidência real pode estar em torno de 10%⁽¹¹⁵⁾.

É provável que a hipercoagulabilidade ocorra porque o endotélio vascular, estimulado pela interação entre produtos micobacterianos e o sistema monócito-macrófago do hospedeiro, passa a sintetizar grandes quantidades de TNF- α e IL-6. Essas citocinas induzem a resposta de fase aguda, que altera os níveis das proteínas de coagulação, como o fibrinogênio e fator VIII, desencadeando distúrbios na

homeostase e levando ao estado de hipercoagulabilidade. Todas essas alterações desaparecem após o tratamento.

Além de suprimir a imunidade mediada por células, assim como a produção de IFN- γ e das demais citocinas pró-inflamatórias, como já foi discutido anteriormente, o TGF- β tem sido apontado como um indutor da proliferação celular e angiogênese em sítios de inflamação ^(16,98,108). Berse *et al* ⁽¹¹⁶⁾, na artrite reumatóide, comparando a capacidade de diferentes citocinas em estimular a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), pelos fibroblastos sinoviais humanos, identificaram o TGF- β como o mais forte indutor de secreção dessa substância.

Também Pertovaara *et al* ⁽¹¹⁷⁾, em estudo com células embrionárias de camundongo, investigaram o possível efeito angiogênico do TGF- β . De acordo com os autores, o estímulo dessa citocina causa a biossíntese e acúmulo de VEGF no compartimento extracelular que circunda as células endoteliais dos vasos sanguíneos.

O VEGF, potente mediador angiogênico, mitogênico e com capacidade de aumentar a permeabilidade vascular das células endoteliais, está associado, com doenças inflamatórias crônicas, como a doença de Crohn ^(118,119) e a tuberculose ⁽¹²⁰⁻¹²⁴⁾. Nesse sentido, Matsuyama *et al* ⁽⁴⁸⁾, utilizando coloração imunohistoquímica em material de biópsia de doentes com tuberculose, mostraram a presença de VEGF nos macrófagos pulmonares que circundavam a lesão, associando-o com a patogênese da

doença. Em outro estudo esses autores investigaram a fonte celular de VEGF em pacientes com tuberculose, utilizando cultura de células mononucleares de sangue periférico, estimuladas com PPD e analisadas por citometria de fluxo. Observaram que o PPD era capaz de aumentar a produção de VEGF, especialmente nos linfócitos T *in vitro*, aumento que era inibido pela adição de anticorpo anti MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II⁽¹²⁵⁾. Como as moléculas de MHC de classe II, têm importante papel na apresentação de antígeno reconhecido pelos linfócitos T CD4+, sugeriram ser essa célula uma importante fonte de VEGF. Mostraram ainda, que a produção de VEGF na cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose é antígeno-específica, pois o PPD induziu, com maior intensidade que o LPS, a produção de VEGF pelos linfócitos T CD4+⁽¹²⁵⁾. Matsuyama *et al*⁽⁴⁸⁾ ainda encontraram níveis séricos de VEGF mais altos em 43 pacientes com tuberculose pulmonar ativa do que nos 29 pacientes com tuberculose inativa e nos 11 com bronquite aguda. Em em oito indivíduos com tuberculose MDR, os níveis continuaram elevados após o tratamento, o que sugere que é a involução do processo inflamatório, e não a presença das drogas, que causa a diminuição do VEGF. Em sete dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, verificaram diminuição dos níveis séricos de VEGF durante o tratamento. Entretanto não observaram diferença significativa entre os níveis de VEGF ao terceiro e sexto meses de tratamento⁽⁴⁸⁾.

Estudos conduzidos por Alatas *et al* ⁽⁵⁶⁾ tiveram resultados semelhantes, demonstrando, no soro de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, valores de VEGF aproximadamente duas vezes acima dos encontrados nos pacientes com doença inativa. Esses autores seguiram o tratamento de dez doentes tuberculosos e observaram que os níveis séricos de VEGF foram menores ao final da terapia, acompanhando a melhora clínica ⁽⁵⁶⁾.

Concordam com esses achados os resultados do presente estudo, que demonstraram níveis séricos de VEGF mais elevados nos pacientes com tuberculose pulmonar em atividade antes da terapia, inclusive com valores até três vezes maiores que os do grupo controle. Ainda, foi demonstrado que os níveis séricos de VEGF, diminuíram significativamente aos três meses e no final do tratamento, acompanhando a melhora clínica desses pacientes.

Abe *et al* ⁽¹²¹⁾, estudando os níveis séricos de VEGF em pacientes com tuberculose pulmonar, observaram que aqueles sem lesões cavitárias, tinham níveis séricos de VEGF mais altos que os controles saudáveis e pacientes com cavidade pulmonar característica, discordando dos resultados obtidos nos estudos anteriores. No estudo ora em discussão, não se avaliou o tipo de lesão radiológica pulmonar dos doentes.

Ainda são poucos os estudos demonstrando o aumento de VEGF no soro de pacientes com tuberculose pulmonar e poucos também são os marcadores sorológicos que possam refletir a atividade da doença ^(48,56,121,126-128).

No presente estudo, o soro, como via de determinação do VEGF em pacientes com tuberculose pulmonar, concordando com outros relatos citados, foi à via de escolha, por se tratar de método pouco evasivo, de simples execução e que fornece resultados rápidos, confiáveis e facilmente reprodutíveis^(45,53,118). Ainda, no presente estudo, os níveis séricos de IFN- γ e TNF- α , assim como de IL-10 e TGF- β , dos pacientes com tuberculose pulmonar mostraram forte correlação positiva com os do sobrenadante de cultura de células mononucleares e de monócitos do sangue periférico, fato que sugere que valores de citocinas que possam indicar atividade da doença podem ser pesquisados no soro.

Finalmente, de acordo com os resultados aqui obtidos, antes do tratamento, momento de grande atividade da doença, era grande a concentração de citocinas pró-inflamatórias, assim como das antiinflamatórias, perfil característico do processo tuberculoso nessa fase, que é de combate ao agente e de defesa contra a lesão tecidual ocasionada pelo combate. Também, corroborando os resultados dos marcadores imunopatogênicos, foram encontrados níveis séricos aumentados das proteínas de fase aguda inflamatória, PCR e VHS, inespecíficas, mas com boa sensibilidade para esse propósito. Interessante foi poder observar, nesse estudo de marcadores de atividade do processo tuberculoso, que o VEGF, como já anunciado por outros autores, também se mostrou bom indicador de atividade inflamatória. Sua dinâmica foi equiparável à dos outros tradicionalmente utilizados. O ineditismo deste trabalho, no entanto, foi verificar que houve correlação positiva entre os

marcadores de atividade tuberculosa, já disponíveis e o VEGF, o que sinaliza para a possibilidade de se escolher, segundo a conveniência do momento, qual indicador utilizar. Novos trabalhos são esperados para que se possa confirmar, com casuística mais expressiva, sua utilidade como único indicador de atividade da doença, para auxiliar na decisão quanto a se introduzir o teste terapêutico e para acompanhar a resposta ao tratamento específico nos doentes com tuberculose pulmonar, principal fonte de disseminação da doença.

Conclusões

VI - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo:

- Entre as citocinas estudadas o IFN- γ foi a que melhor refletiu a resposta ao tratamento antituberculose.
- O soro se mostrou via confiável para a determinação das citocinas, sendo capaz de refletir a atividade sistêmica .
- PCR e VHS foram os melhores marcadores inespecíficos de fase aguda, inflamatória.
- O VEGF se mostrou um promissor marcador de atividade inflamatória na tuberculose, pois apresentou altos níveis séricos inicialmente que diminuíram ao longo do tratamento. Valores ainda ligeiramente elevados, encontrados ao final do tratamento, podem refletir a atividade de neovascularização reparadora da destruição tecidual, própria da atividade inflamatória da tuberculose.



Referências Bibliográficas

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption- a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101:697-714.

2. Brasil.Ministério da Saúde. 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>.

3. World Health Organization Publications, 1991-2000. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Bull World Health Organ 2001; 79: 71-5.

4. Yew WW, Leung CC.Update in tuberculosis 2005.Am J Respir Crit Care Med. 2006;173:491-8.

5. Martin A, Portales F. Drug-resistance and drug-resistance detection. In: Palomino JC, Leão SC, Ritaco V. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. 2007. Available from: www.TuberculosisTextbook.com

-
6. Loddenkemper R, Sagebiel D, Brendel A. Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J.* 2002;36:66-77.
 7. Sharma SK, Mohan A. Scientific basis of directly observed treatment, short-course (DOTS). *J Indian Med Assoc.* 2003;101:157-8
 8. Dias-Baptista IMF, Usó SMRS, Marcondes-Machado J. Trends in multidrug-resistant tuberculosis. Review. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2008; 14: 203-23.
 9. Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2006;55:301-5.
 10. Sharma SK, Mohan A. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004 ;120:354-76.
 11. Sharma SK, Mohan A. Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest.* 2006;130:261-72.

-
12. Zignol M, Hosseini MS, Wright A, Weezenbeek CL, Nunn P, Watt CJ, Williams BG, Dye C. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis.* 2006 ;194:479-85.

 13. 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.

 14. Organização Mundial da Saúde. Los servicios de laboratorio em el control de la tuberculosis – microscopia e cultivo. Genebra: Organización Mundial de la Salud, Genebra, Suissa, 1998.

 15. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest.* 2007;131:1898-906.

 16. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:294-309.

 17. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004;120:213-32.

-
- 18.** Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Byrd MG, KazembePN, Dobbie H et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8: 1097-103.
- 19.** Flynn JI, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol* 2001;19: 93-129.
- 20.** Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679-91.
- 21.** Collins LH, Kaufmann SHE. The many faces of host responses to tuberculosis. Review Article. *Immunology* 2001; 103:1-9.
- 22.** 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.
- 23.** Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavolon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, 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.

-
24. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(Suppl): 54-8.
25. Worku S, Hoft DF. Differential effects of control and antigen-specific T cells on intracellular mycobacterial growth. *Infect Immun.* 2003; 71:1763-73.
26. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1990;12: 721-7.
27. Eun-Kyeong J, Jeong-Kyu P, Hazel MD. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 205-10.
28. Jaffe HA, Buhl R, Mastrangeli A, Holroyd KJ, Saltini D, Czerski HS et al. Organ specific cytokine therapy: local activation of mononuclear phagocytes by delivery of an aerosol of recombinant interferon-gamma to the human lung. *J Clin Invest* 1991;88: 297-302.
29. Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 1980; 286: 79-80.

-
- 30.** Balcewics-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998; 161: 2636-41.
- 31.** Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet* 1997; 349: 1513-5.
- 32.** Bakir M, Millington KA, Soysal A, Deeks JJ, Efee S, Aslan Y et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon-gamma biomarker in children with tuberculosis contact. *Ann Intern Med*
- 33.** Golletti D, Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:12-26.
- 34.** Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochar T. Contribution of a IFN- γ assay in contact tracing for tuberculosis in a low-incidence, high immigration area. *Swiss Med Wkly* 2008; 138: 585-93.

-
- 35.** Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol.* 2002;168:4620-7.
- 36.** Bekker LG, Maartens G, Steyn L, Kaplan G. Selective increased in plasma tumor necrosis factor-alpha and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. *J Infect Dis* 1998;178(2):580-4.
- 37.** Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1997;90:607-17.
- 38.** Mustafa T, Phyu S, Nilsen R, Jonsson R, Bjune G. In situ expression of cytokines and cellular phenotypes in the lungs of mice with slowly progressive primary tuberculosis. *Scand J Immunol* 2000;51: 548-56.
- 39.** Lai CKW, Sheng H Chan CHS, Chan J, Choy D, Leung R et al. Cytokine gene expression profile of circulating CD4 sup+ T cells in active pulmonary tuberculosis. *Chest* 1997; 111: 606-11.

40. Orme IM, Collins FM. Adoptive protection of Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell Immunol* 1984; 84:113-20.

41. Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, Urizar L, Rondelli CFM, Largacha C et al. In vitro synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement. *Scand J Immunol* 1999;49: 210-7.

42. Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, Wilkinson K, Ellner JJ and Toossi Z. Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced Transforming growth factor β 1 and interleukin-10. *Infc and Immun* 1999; 5730-5.

43. Toosi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF β by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF β in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 1995; 154: 465-73.

44. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A and Boom WH. Regulation of human CD4+ $\alpha\beta$ T-cell-receptor-positive (TCR+) and $\gamma\delta$ TCR+ t-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor β . Infect and immune1999; 6461-72.

45. Hirch CS, Hussain R, Tosí Z, Dawood G, Shahid F and Ellner JJ. Cross-modulation by transforming growth factor β in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon γ production. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 3193-8.

46. Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. EXS. 1997;79:233-69.

47. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. J Exp Med. 1994;180:341

-
- 48.** Matsuyama W, Hashiguchi T, Matsumuro K, Iwami F, Hirotsu Y, Kawabata M, et al. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1120-2.
- 49.** Robson S, White NW, Aronson I, Woolgar R, Goodman H and Jacobs P. Acute –phase response and the hypercoagulable state in pulmonary tuberculosis. *Brit J of Haemat* 1996; 93: 943-9.
- 50.** Walsh DA and Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res* 2001, 3: 147-53.
- 51.** Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; 113: 1040-50.
- 52.** Perez RL, Roman J, Staton Junior GW and Hunter RL. Extravascular coagulation and fibrinolysis in murine lung inflammation induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6-dimycolate. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149 (2): 510-8.

-
- 53.** Saita N, Fujiwara N, Yano I, Soejima K and Kobayashi K. Trehalose-6,6-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect and Immun* 2000: 5991-7.
- 54.** Sakaguchi I, Ikeda N, Nakayama M, Kato Y, Yano I and Kaneda K. Trehalose-6,6-dimycolate (cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages. *Infect Immun* 2000: 2043-52.
- 55.** Osawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest* 2004; 113: 516-27
- 56.** Alatas F, Alatas O, Metintas M, Ozarslan A, Erginel S, Yildirim H. Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis. *Chest*. 2004;125:2156-9.
- 57.** Lawn SD, Obeng J, Acheampong JW, Griffin GE. Resolution of the acute-phase response in West African patients receiving treatment for pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4:340-4.

-
- 58.** Unsal E, Aksaray S, Köksal D, Sipit T. Potential role of interleukin 6 in reactive thrombocytosis and acute phase response in pulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J.* 2005;81:604-7.
- 59.** Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;277:50.
- 60.** Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448.
- 61.** Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005; 6:1045-56.
- 62.** Yoo JY, Desiderio S. Innate and acquired immunity intersect in a global view of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1157-62.
- 63.** Jeppson JO, Laurell CB, Franzén B. Agarose gel electrophoresis. *Clin Chem.* 1979;25:629-38.
- 64.** van Oss CJ, Bronson PM, Border JR. Changes in the serum alpha glycoprotein distribution in trauma patients. *J Trauma.* 1975;15:451-5.

-
- 65.** Deodhar SD. C-reactive protein: the best laboratory indicator available for monitoring disease activity. *Cleve Clin J Med.* 1989; 56:126-30.
- 66.** Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scans J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89.
- 67.** Brasil. Ministério da Saúde. Campanha estadual de busca ativa de tuberculose, 2000. Coordenação dos institutos de pesquisa da secretaria de Estado da Saúde- Centro de vigilância epidemiológica Prof. “Alexandre Vranjac” CVE Divisão Tuberculose. [cited 2001 Jun 21]. Available from: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>
- 68.** 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.
- 69.** 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.

-
- 70.** Lee CH, Kim WJ, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yim JJ. Response to empirical anti-tuberculosis treatment in patients with sputum smear-negative presumptive pulmonary tuberculosis. *Respiration*. 2005;72:369-74.
- 71.** Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005; 85:53-64.
- 72.** Walker D, Jason J, Wallace K, Slaughter J, Whatley V, Han A, Nwanyanwu OC, Kazembe PN, Dobbie H, Archibald L, Jarvis WR. Spontaneous cytokine production and its effect on induced production. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 ;9:1049-56.
- 73.** Ribeiro-Rodrigues R, Resende CT, Johnson JL et al.. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 818-23.
- 74.** Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2703-8.

75. Hansted E, Sitkauskiene B, Kevalas R, Tattersall A, Day T. Research for practice: a new in vitro test for identification of tuberculosis infection. *Medicina (Kaunas)*. 2007;43(7):519-22.

76. Joh JS, Lee CH, Lee JE, Park YK, Bai GH, Kim EC, Han SK, Shim YS, Yim JJ. The interval between initiation of anti-tuberculosis treatment in patients with culture-positive pulmonary tuberculosis and receipt of drug-susceptibility test results. *J Korean Med Sci*. 2007; 22:26-9.

77. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, Nelwan RH, Marzuki S, van der Meer JW, van Crevel R, van de Vosse E, Ottenhoff TH. 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.

78. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, Britton S. Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol*. 2001; 53:85-91.

-
- 79.** 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.
- 80.** Ordway DJ, Martins MS, Costa LM, Freire MS, Arroz MJ, Dockrell HM, Ventura FA. Increased IL-4 production in response to virulent *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients with advanced disease] *Acta Med Port*. 2005;18:27-36.
- 81.** 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;69:3497-501.
- 82.** Lazarevic V, Nolt D, Flynn JL. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses. *J Immunol*. 2005;175:1107-17.
- 83.** Kart L, Buyukoglan H, Tekin IO, Altin R, Senturk Z, Gulmez I, Demir R, Ozesmi M. Correlation of serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-4 and soluble interleukin-2 receptor levels with radiologic and clinical manifestations in active pulmonary tuberculosis. *Mediators Inflamm*. 2003;12:9-14.

-
- 84.** Portales-Pérez DP, Baranda L, Layseca E, Fierro NA, de la Fuente H, Rosenstein Y, González-Amaro R. Comparative and prospective study of different immune parameters in healthy subjects at risk for tuberculosis and in tuberculosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:299-307.
- 85.** Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med.* 2001;345:1098-104.
- 86.** Yun JW, Lim SY, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ, Cha HS, Koh EM, Koh WJ. Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection in arthritis patients treated with tumor necrosis factor antagonists in Korea. *J Korean Med Sci.* 2007;22:779-83.
- 87.** Long R, Gardam M. Tumour necrosis factor-alpha inhibitors and the reactivation of latent tuberculosis infection. *CMAJ.* 2003; 168:1153-6.
- 88.** Deveci F, Akbulut HH, Turgut T, Muz MH. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators Inflamm.* 2005;5:256-62.

-
- 89.** Jo EK, Park JK, Dockrell HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:205-10.
- 90.** Koo IC, Ohol YM, Wu P, Morisaki JH, Cox JS, Brown EJ. Role for lysosomal enzyme beta-hexosaminidase in the control of mycobacteria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:710-5.
- 91.** Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun.* 1996 ;64:1351-6.
- 92.** Van-Lume DS, Souza JR, Melo WG, Melo VL, Cabral MM, Rego JC, Schindler HC, Abath FG, Montenegro SM. Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on T cell responses to ESAT-6 and PPD antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:401-4.
- 93.** Burgess LJ, Reuter H, Carstens ME, Taljaard JJ, Doubell AF. Cytokine production in patients with tuberculous pericarditis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:439-46.

-
- 94.** Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJ, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol.* 1999;115:110-3.
- 95.** Berktas M, Guducuoglu H, Bozkurt H, Onbasi KT, Kurtoglu MG, Andic S. Change in serum concentrations of interleukin-2 and interferon-gamma during treatment of tuberculosis. *J Int Med Res.* 2004;32:324-30.
- 96.** Dlugovitzky D, Bay ML, Ratani L, Fiorenza G, Vietti L, Farroni MA, Bottasso OA. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol.* 2000;122:343-9.
- 97.** Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun.* 1993;61:3482-9.

-
- 98.** Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Boéchat N, Huard RC, Chitale S, Doo H, Geng J, Rego L, Lazzarini LC, Kritski AL, Johnson WD Jr, McCaffrey TA, Silva JR. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun.* 2004;72:2628-34.
- 99.** Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180:5771-7.
- 100.** Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:89195.
- 101.** Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med.* 2007;204:2159-69.
- 102.** O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.* 2004;114:1372-8.
- 103.** O'Garra A & Vieira P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature* 2007;7:425-8.

104. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 803-10.

105. Sher A, Gazzinelli RT, Jankovic D, Scharon-Kersten T, Yap G, Doherty TM, Wynn T. Cytokines as determinants of disease and disease interactions. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:85-7.

106. Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32:76-102.

107. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest.* 2000;105:1317-25.

108. Chung CL, Chen CH, Sheu JR, Chen YC, Chang SC. Proinflammatory cytokines, transforming growth factor-beta1, and fibrinolytic enzymes in loculated and free-flowing pleural exudates. *Chest.* 2005;128:690-7.

109. Fiorenza G, Rateni L, Farroni MA, Bogué C, Dlugovitzky DG. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity. *Immunol Lett.* 2005; 98:45-8.

110. Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, Pitossi F, Gauldie J. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2001; 107:1529-36.

111. Gauldie J, Jordana M, Cox G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1993;48:931-5.

112. Margetts PJ, Kolb M, Yu L, Hoff CM, Holmes CJ, Anthony DC, Gauldie J. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. *Am J Pathol.* 2002;160:2285-94.

113. Baynes RD, Bothwell TH, Flax H, McDonald TP, Atkinson P, Chetty N, Bezwoda WR, Mendelow BV. Reactive thrombocytosis in pulmonary tuberculosis. *J Clin Pathol.* 1987;40:676-9.

114. Caner SS, Köksal D, Ozkara S, Berkoğlu M, Aksaray S, Tarhan D. The relation of serum interleukin-2 and C-reactive protein levels with clinical and radiological findings in patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberk Toraks*. 2007;55:238-45.

115. Turken O, Kunter E, Sezer M, Solmazgul E, Cerrahoglu K, Bozkanat E, Ozturk A, Ilvan A. Hemostatic changes in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:927-32.

116. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF- β) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 1999;115:176-82.

117. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*. 1994;269:6271-4.

118. Pousa ID, Maté J, Sacedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert J. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14: 61-7.

119. Bousvaros A, Leichtner A, Zurakowski D, Kwon J, Law T, Keough K et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor in children and young adults with Crohn's disease. *DigDis & Scs* 1999;44: 424-30.

120. Hua CC, Chang LC, Chen YC, Chang SC. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest*. 1999;116:1292-6.

121. Abe Y, Nakamura M, Oshika Y, Hatanaka H, Tokunaga T, Ohkubo Y, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor and cavity formation in active pulmonary tuberculosis. *Respiration*. 2001;68:496-500.

122. Hamed EA, El-Noweihi AM, Mohamed AZ, Mahmoud A. Vasoactive mediators (VEGF and TNF-alpha) in patients with malignant and tuberculous pleural effusions. *Respirology*. 2004; 9:81-6.

123. Lim SC, Jung SI, Kim YC, Park KO. Vascular endothelial growth factor in malignant and tuberculous pleural effusions. *J Korean Med Sci*. 2000;15:279-83.

124. Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2825-30.

125. Matsuyama W, Kubota R, Hashiguchi T, Momi H, Kawabata M, Nakagawa M, et al. Purified protein derivative of tuberculin upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in T lymphocytes in vitro. *Immunology*. 2002;106:96-101.

126. Moura EP, Toledo VP, Oliveira MH, Spíndola-de-Miranda S, Andrade HM, Guimarães TM. Pulmonary tuberculosis: evaluation of interferon-gamma levels as an immunological healing marker based on the response to the Bacillus Calmette-Guerin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:283-7.

127. Brahmabhatt S, Black GF, Carroll NM, Beyers N, Salker F, Kidd M, Lukey PT, Duncan K, van Helden P, Walzl G. Immune markers measured before treatment predict outcome of intensive phase tuberculosis therapy. *Clin Exp Immunol*. 2006;146:243-52.

128. Köksal D, Unsal E, Poyraz B, Kaya A, Savaş H, Sipit T, Gönüllü U. The value of serum interferon-gamma level in the differential diagnosis of active and inactive pulmonary tuberculosis. *Tuberk Toraks*. 2006;54 (1):17-21.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. National Library of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington; 2003. 240p.

Resumo



RESUMO

Ainda nos dias de hoje, a procura por bons marcadores, capazes de indicar o sucesso ou falha da terapêutica antituberculose, tem sido uma preocupação constante. Este estudo teve por objetivo avaliar o papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), potente mediador angiogênico e de permeabilidade vascular, como marcador de atividade da tuberculose pulmonar (TBP), durante o tratamento específico, comparando-o aos níveis de citocinas e às provas de fase aguda inflamatória. Para isso, foram avaliados os níveis de VEGF séricos, das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β , no soro e em PBMC e as provas de fase aguda inflamatória VHS, PCR, α 1-GPA, PT, globulina e albumina, em 42 doentes com TBP e 20 controles saudáveis. Os doentes foram avaliados antes, aos três meses e ao final do tratamento e o grupo controle em apenas um momento, para determinar os valores de referência das citocinas e do VEGF. As citocinas aqui estudadas apresentaram concentrações mais elevadas na TBP em atividade, que foram diminuindo ao longo do tratamento e, ao final, somente o IFN- γ teve níveis comparáveis aos do grupo controle. Também os níveis das citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC apresentaram correlação positiva com aqueles encontrados no soro. Do mesmo modo, os níveis séricos de VEGF, que atingiram valores altos na tuberculose em atividade, apresentaram queda significativa no decorrer da terapia, retornando a valores muito próximos aos encontrados nos

indivíduos normais, após o tratamento. Apenas o VHS e a PCR, entre os marcadores inespecíficos de fase aguda inflamatória, mostraram-se bons marcadores de atividade da doença. Neste estudo de marcadores de atividade do processo tuberculoso, o VEGF se mostrou bom indicador de inflamação, com dinâmica comparável à dos outros tradicionalmente utilizados. O fato de ser determinado no soro, a metodologia simples de execução, que fornece resultados rápidos e facilmente reprodutíveis, tornam esse potencial marcador de atividade bastante promissor. Os achados desta pesquisa sinalizam para a necessidade de novos estudos, com casuística mais expressiva, que confirmem sua utilidade como marcador de atividade da doença, para auxiliar na decisão quanto à introdução do teste terapêutico e acompanhar a resposta ao tratamento específico nos doentes com tuberculose pulmonar.

Abstract



ABSTRACT

Tuberculosis still is a matter of concern in public health, with thousands of cases worldwide every year. Nevertheless, the lack of good markers to indicate success or failure of anti-tuberculosis therapy and the increase of MDR tuberculosis persist. The aim of the present study was to evaluate the potential of the vascular endothelial growth factor (VEGF), as a marker of pulmonary tuberculosis (PTB) activity during treatment, compared to cytokine levels and acute phase tests; and to correlate serum to PBMC cytokines levels. Serum VEGF, serum and PBMC cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β and the acute phase response VHS, PCR 1-GPA, PT, globulin and albumin were measured in 42 patients with PTB and 20 healthy controls. Blood of PTB patients was collected before beginning, at three months and at the end of the treatment. The control group was evaluated in just one moment to determine the reference values. In the present study, the serum cytokine levels, although lower, showed strong correlation with those obtained in PBMC. The serum levels of VEGF reached very high values in the active tuberculosis, with a significant drop during therapy, presenting close to normal values after successful treatment. Serum and PBMC cytokines also presented very high concentrations in active PTB, reducing with treatment, but only IFN- γ reached normal values. Only HSV and CRP tests, among those of acute phase response studied, were good markers of disease activity, although they were nonspecific. Measuring serum

VEGF levels seems to be a good marker of PTB activity, making it a useful monitor of response to antituberculosis treatment. Furthermore, VEGF can be easily assessed in the serum, what makes it a less invasive and safer marker to reflect the activity of the disease in PTB patients. Its association with IFN- γ , and acute phase CRP and HSV tests could increased its specificity as a tuberculosis activity marker detecting possible cases of resistance to treatment. Further studies with larger casuistics are needed to confirm the role of VEGF as a marker of PTB activity.

keywords pulmonary tuberculosis, VEGF, activity marker , cytokines, acute-phase response, anti-tuberculosis treatment.

Apêndices



Apêndice 1

Valores de referência para as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β e VEGF e caracterização do grupo de doadores de sangue

Controle	Idade	Sexo	TNF- α			IFN- γ			IL-10			TGF- β			VEGF
			soro	s/ LPS	c/ LPS	Soro	s/ PHA	c/ PHA	soro	s/ LPS	c/ LPS	soro	s/LPS	c/LPS	soro
1	31	M	66	84	111	108	121	240	4	10	21	86	92	217	63
2	41	M	117	133	241	174	201	256	10	15	27	104	118	428	126
3	28	M	86	101	204	118	236	304	10	14	20	124	135	613	231
4	38	M	109	118	206	211	226	284	12	21	36	180	230	646	384
5	52	M	96	110	196	244	286	380	19	26	38	204	236	417	276
6	45	M	78	81	104	161	210	309	0	0	5	189	204	417	186
7	48	M	131	166	304	284	306	366	0	6	12	103	142	306	202
8	33	M	121	181	318	142	204	296	6	6	10	85	96	294	101
9	56	M	108	126	274	204	246	322	0	5	12	219	224	587	121
10	31	M	76	86	126	226	294	381	5	15	20	174	201	489	244
11	36	M	93	121	202	290	330	384	5	11	19	113	143	471	291
12	27	M	85	106	218	268	346	381	0	0	7	181	208	481	188
13	43	M	110	120	181	179	206	291	0	5	12	229	242	608	91
14	47	M	81	105	118	210	263	300	10	15	18	116	129	374	163
15	24	M	116	128	231	246	270	296	5	5	10	90	118	349	231
16	25	M	127	190	284	260	284	321	0	7	10	115	201	404	141
17	35	M	80	96	113	124	188	246	0	5	16	134	163	454	138
18	37	M	128	156	206	181	248	296	10	16	29	121	142	484	86
19	36	M	98	121	201	148	181	304	0	0	0	180	221	599	301
20	48	M	135	180	246	261	301	369	0	6	14	138	281	531	284

(G1).

Este grupo possui apenas um momento para a obtenção dos valores de referência

Apêndice 2

Valores de TNF- α de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar), no soro e em sobrenadante de PBMC com e sem estímulo, durante o tratamento de TBP.

Pacientes	TNF- α								
	M1			M2			M3		
	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim
1	*	126	218	94	101	148	76	81	121
2	*	630	821	381	411	632	128	149	161
3	400	416	504	378	381	426	348	342	488
4	396	489	526	191	212	311	91	106	214
5	370	381	466	222	240	318	105	120	209
6	540	638	820	286	417	521	184	206	281
7	281	288	361	206	241	355	200	246	361
8	304	317	441	201	294	381	90	98	162
9	436	540	620	303	320	444	104	110	126
10	202	321	488	320	331	492	311	320	484
11	318	488	580	204	231	417	121	143	201
12	*			188	236	417	161	216	384
13	501	617	741	316	421	494	*		
14	186	287	318	171	191	231	108	148	216
15	516	620	788	217	246	291	111	98	161
16	791	804	981	430	304	447	189	214	388
17	248			239	207	380	118	104	189
18	408			388	408	608			
19	482	510	584	303	621	786	209	273	584
20	505	544	680	480	310	394	471	410	511
21	380	410	495	270	281	386	141	183	214
22	212	303	391	200	284	291	185	180	204
23	642	689	804	421	517	610	222	286	301
24	516			480	489	521			
25	394			381	364	417	*		
26	380	402	630	342	520	849	201	410	510
27	630	710	804	481	610	780	232	441	520
28	408	510	600	310	401	330			
29	534	581	710	417	431	701	214	221	536
30	456	630	641	321	416	506			
31	286	304	417	242	263	407	104	121	221
32	346	401	491	*			*		
33	561	726	910		706	819			
34	522			411	630	774	222	444	622
35	274			260	282	396	172	192	307
36	303	390	630	292	361	587	*		
37	780	841	899						
38	423	446	804	317	388	520	187	204	266
39	380	418	620						
40	246	417	710						
41	293	330	441						
42	323	417	521						

M1= antes do tratamento
M2= três meses após o tratamento
M3= final do tratamento

Apêndice 3

Valores de IFN- γ de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar), no soro e em sobrenadante de PBMC com e sem estímulo, durante o tratamento de TBP

Pacientes	IFN- γ								
	M1			M2			M3		
	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim
1	*	418	547	485	516	610	420	421	584
2	*	314	416	196	216	288	158	180	248
3	300	321	387	211	217	246	191	208	221
4	274	286	346	306	320	481	161	210	281
5	402	480	561	278	307	316	174	186	241
6	294	327	418	108	218	264	194	204	222
7	620	817	981	670	789	896	480	511	704
8	154	210	384	160	181	294	88	111	139
9	331	418	526	204	217	340	109	140	209
10	617	646	780	631	651	774	586	591	762
11	670	680	720	514	581	619	204	288	431
12	*			236	248	281	207	381	490
13	676	825	990	420	630	671	*		
14	817	904	1060	630	788	861	321	216	417
15	320	481	517	304	386	417	281	290	310
16	329	342	407	210	286	330	186	206	387
17	387			246	263	304	180	249	263
18	300			311	401	487			
19	630	681	746	446	488	518	186	204	293
20	688	704	863	421	361	394	306	341	381
21	740	826	866	610	810	911	404	611	704
22	789	801	926	741	781	900	462	443	718
23	417	486	720	310	341	611	236	281	340
24	404	306	424	381					
25	604	636	717	557			*		
26	708	733	994	611	707	816	330	488	720
27	401	463	581	210	241	304	120	180	246
28	810	826	896	680	721	788			
29	610	640	761	500	618	710	237	341	404
30	320	431	499	210	241	288			
31	536	584	617	481	500	581	236	318	407
32	301	362	480	*			*		
33	749	910	1121		846	997			
34	327			249	256	304	187	209	196
35	820			782	811	904	647	788	866
36	691	756	910	572	621	827	*		
37	401	422	788						
38	710	794	918	320	410	444	204	249	301
39	681	692	776						
40	420	518	804						
41	361	406	580						
42	420	610	688						

M1= antes do tratamento
M2= três meses após o tratamento
M3= final do tratamento

Apêndice 4

Valores de IL-10 de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar), no soro e em sobrenadante de PBMC com e sem estímulo, durante o tratamento de TBP

Pacientes	IL-10								
	M1			M2			M3		
	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim
1	*	20	36	10	10	18	10	10	21
2	*	56	88	12	26	46	10	10	21
3	69	81	97	72	78	104	50	75	98
4	48	59	76	28	55	68	5	46	65
5	22	38	56	9	16	26	6	8	17
6	24	37	61	16	26	44	13	15	21
7	71	84	101	56	69	88	31	46	60
8	21	36	44	9	16	26	5	5	10
9	32	38	61	12	16	27	10	10	15
10	28	42	68	32	44	72	30	41	68
11	3	46	73	20	33	56	9	16	24
12	*			56	61	86	26	33	51
13	78	104	196	51	44	63	*		
14	87	101	136	56	77	81	21	33	63
15	76	88	96	68	63	81	48	54	61
16	79	104	138	56	62	86	40	48	61
17	41			26	33	76	11	22	38
18	74			63	76	101			
19	57	63	81	19	44	51	10	20	36
20	44	51	77	22	29	26	18	26	21
21	61	74	88	43	46	62	22	31	44
22	36	45	59	33	41	50	26	34	77
23	41	49	73	31	41	60	16	22	44
24	37	24	31	16					
25	46	34	41	21			*		
26	51	66	84	30	42	61	11	21	44
27	39	51	74	20	31	34	10	10	10
28	56	63	86	40	52	62			
29	76	83	94	42	70	76	22	31	33
30	42	49	63	39	40	61			
31	46	51	74	44	46	70	23	30	54
32	77	81	96	*			*		
33	63	88	94		74	87			
34	48			33	44	51	30	34	47
35	52			44	46	51	40	41	48
36	54	55	88	47	48	71	*		
37	76	106	149						
38	29	46	84	24	31	40	18	22	26
39	40	51	73						
40	35	49	72						
41	39	43	63						
42	61	74	89						

M1= antes do tratamento

M2= três meses após o tratamento

M3= final do tratamento

Apêndice 5

Valores de TGF- β de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar), no soro e em sobrenadante de PBMC com e sem estímulo, durante o tratamento de TBP

Pacientes	TGF- β								
	M1			M2			M3		
	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim	soro	PBMC s/estim	PBMC c/estim
1	*	885	1121	418	544	863	231	364	505
2	*	788	940	346	381	617	222	240	388
3	817	944	1022	710	874	991	621	792	903
4	487	630	820	259	426	517	121	184	242
5	301	390	518	213	261	404	106	186	321
6	418	533	728	211	318	646	148	204	334
7	680	689	794	421	504	596	341	401	477
8	443	508	721	309	346	536	210	303	399
9	580	630	817	303	410	630	187	216	240
10	212	218	468	231	230	480	226	230	472
11	487	518	786	346	384	651	206	291	330
12	*			520	680	816	246	417	522
13	681	720	842	304	444	581	*		
14	284	340	641	181	280	410	101	220	313
15	518	588	789	320	621	781	204	289	996
16	560	746	904	381	661	823	180	237	441
17	349			301	440	721	221	386	534
18	517			456	488			789	
19	611	804	1016	414	798	874	316	448	506
20	411	517		388	420	680	374	391	549
21	630	820	1120	410	710	940	236	301	717
22	381	536	817	352	533	781	349	521	662
23	506	536	880	310	388	610	204	241	440
24	436	484	617	411					
25	488	600	689	320			*		
26	518	880	1031	504	717	930	300	420	680
27	508	610	694	342	421	517	231	340	356
28	611	642	881	504	543	620			
29	704	794	939	617	649	717	304	387	390
30	581	633	963	484	594	892			
31	492	630	942	480	633	894	234	418	522
32	706	756	917	*			*		
33	804	1010	1110		906	984			
34	448			392	412	507	320	296	480
35	630			577	589	789	491	464	640
36	520	563	817	417	472	707	*		
37	617	641	918						
38	331	400	621	210	311	384	118	216	177
39	449	630	908						
40	361	380	721						
41	455	583	704						
42	601	840	1010						

M1= antes do tratamento
M2= três meses após o tratamento
M3= final do tratamento

Apêndice 6

Valores de VEGF sérico de G2 (grupo de doentes com tuberculose pulmonar).

Paciente	VEGF sérico		
	M1	M2	M3
1	*	276	181
2	*	586	306
3	788	621	610
4	423	206	174
5	510	301	189
6	477	386	132
7	612	414	374
8	488	321	134
9	748	313	181
10	423	410	392
11	826	513	240
12	*	487	321
13	790	421	*
14	417	326	281
15	926	781	363
16	889	521	281
17	517	262	184
18	674	590	
19	826	562	211
20	613	407	394
21	396	384	214
22	421	392	
23	708	418	210
24	717	682	
25	489	476	*
26	440	310	181
27	956	704	440
28	742	718	
29	780	626	289
30	721	681	
31	381	280	
32	630	*	*
33	618		
34			
35			
36	366	*	*
37	744		
38	361	210	
39	481		
40	400		
41	480		
42	408		

M1= antes do tratamento

M2= três meses após o tratamento

M3= final do tratamento

Apêndice 7

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

Paciente	VHS		
	M1	M2	M3
1	**	**	40
2	44	10	**
3	20	37	15
4	23	**	2
5	14	**	1
6	51	41	27
7	48	**	**
8	54	19	14
9	35	33	34
10	13	**	18
11	21	15	1
12	55	55	**
13	50	45	**
14	71	14	7
15	40	18	16
16	90	35	14
17	56	30	5
18	11	5	**
19	11	5	5
20	38	28	**
21	11	9,5	5
22	51	10	5
23	82	11	7,5
24	52	7	**
25	8	5	**
26	26	5	7
27	115	35	17
28	88	49	**
29	8	6	5
30	45	17	**
31	60	8	**
32	77	**	**
33	123	21	**
34	90	48	**
35	79	9	5
36	10	7	**
37	121	**	**
38	140	14	25
39	16	**	**
40	28	**	**
41	45	**	**
42	99	**	**

Valor de referência: Homem: até 10 mm/h ; Mulher: até 20 mm/h

M1=antes do tratamento; M2= aos três meses; M3= ao final do tratamento anti-tuberculose.

** dado não disponível.

Apêndice 8

Valores de α -1 glicoproteína ácida (α 1-GPA) do grupo de doentes com tuberculose pulmonar (G2)

Paciente	α -1 glicoproteína ácida		
	M1	M2	M3
1	**	13,2	39
2	236	33	36
3	205	93	88,3
4	126	41,8	56,4
5	157,4	58	51
6	152	48,5	70
7	128	105,1	70,6
8	87	79	91
9	35	115	45
10	79	78,2	67
11	110	63,4	73
12	134	72	**
13	157	25	**
14	174	39	41
15	49	124	81
16	99	60	52,1
17	134	146	129
18	87	**	36
19	87	30	33,2
20	203	82	101,2
21	49	34	48
22	100	158	**
23	110	48	40,4
24	52	135	**
25	61	61	**
26	116	88	37,9
27	168	132	53,9
28	207	127	**
29	89	46	33,7
30	118	42	**
31	26	12	**
32	187	**	**
33	171	**	**
34	176	99	**
35	190	21	**
36	113	**	**
37	175	**	**
38	108	70	**
39	93	**	**
40	65	**	**
41	190	**	**
42	187	**	**

Valor de referência: Homem: 50 -130 g/dl ; Mulher: 40 – 120 g/dl

M1=antes do tratamento; M2= aos três meses; M3= ao final do tratamento anti-tuberculose.

** dado não disponível.

Apêndice 9

Valores de Proteína C-reativa (PCR) do grupo de doentes com tuberculose pulmonar (G2)

Paciente	Proteína C reativa		
	M1	M2	M3
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	11,3	3,9	**
13	17,8	19	**
14	3,9	0,4	0
15	0,8	0,5	0
16	3,8	3,5	0,2
17	2,3	1,4	0
18	0,9	**	0,1
19	0,4	0,1	0
20	2,7	1,2	1,5
21	0,5	0,3	0
22	2,4	0,4	**
23	4,7	0,2	0,2
24	0,1	1,9	**
25	0,7	0,2	**
26	2,3	0,6	0,5
27	3,8	2,8	0,1
28	16,6	2,1	**
29	0,8	0,3	0,1
30	0,7	0,1	**
31	1,3	0,1	**
32	5,8	**	**
33	2,4	**	**
34	7,1	2,3	**
35	3	0,1	**
36	4,2	**	**
37	18	**	**
38	17,4	0,1	**
39	3,7	**	**
40	0,8	**	**
41	7,2	**	**
42	7,1	**	**

Valor de referência: ≤ 1,00 g/dl

M1=antes do tratamento; M2= aos três meses; M3= ao final do tratamento anti-tuberculose.

** dado não disponível.

Apêndice 10

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

Paciente	Proteína totais		
	M1	M2	M3
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	6,8	9,3	**
13	5,5	6,9	**
14	8,8	7,4	7,4
15	8,2	7,7	7,9
16	8,3	8,1	8,6
17	9,6	8,3	7,9
18	8,4	**	8,3
19	7,4	7,6	7,6
20	8,4	7,2	7,8
21	6,7	6,5	7,2
22	8	7,4	**
23	7,9	7,1	7,1
24	2,3	8,3	**
25	7,5	7,6	**
26	7,5	7,2	5,9
27	7,8	7,3	8,3
28	7,3	7,6	**
29	8,7	7,6	8,4
30	7,5	7,3	**
31	8,2	7,5	**
32	8,2	**	**
33	7,9	**	**
34	7,8	8	**
35	6,1	7,1	**
36	7,1	**	**
37	7,4	**	**
38	7,5	7,5	**
39	7,9	**	**
40	7,4	**	**
41	9,6	**	**
42	7,3	**	**

Valor de referência: 6,3 a 8,2 g/dl

M1=antes do tratamento; M2= aos três meses; M3= ao final do tratamento anti-tuberculose.

** dado não disponível.

Apêndice 11

Valores de Globulina do grupo de doentes com tuberculose pulmonar (G2)

Paciente	Globulina		
	M1	M2	M3
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	4,3	5,5	**
13	3,4	4,6	**
14	4,2	3,4	3,1
15	3,3	3,3	3,3
16	4,2	4	3,8
17	4,4	4	3,5
18	3,9	3,3	**
19	3,2	3,4	3,4
20	3,8	3,1	4
21	1,8	2,7	3,3
22	3,9	3,5	**
23	3,5	2,9	2,6
24	1,5	3,5	**
25	2,9	2,8	**
26	3,6	3	3,6
27	4,1	3,6	4,2
28	3,4	3,1	**
29	3,7	3,4	4,1
30	3,8	4,1	**
31	4,2	3,6	**
32	4,2	**	**
33	4,4	**	**
34	3,8	3,4	**
35	3,5	3,1	**
36	3,5	**	**
37	3,2	**	**
38	4,1	3,3	**
39	3,8	**	**
40	3,6	**	**
41	4,1	**	**
42	3,6	**	**

Valor de referência: 2,8 a 3,2 g/dl

M1=antes do tratamento; M2= aos três meses; M3= ao final do tratamento anti-tuberculose.

** dado não disponível.

Apêndice 12

Valores de Albumina do grupo de doentes com tuberculose pulmonar (G2)

Paciente	Albumina		
	M1	M2	M3
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	2,5	3,8	**
13	2,1	2,3	**
14	4,6	4	4,3
15	4,9	4,4	4,6
16	4,1	4,1	4,8
17	5,2	4,3	4,4
18	4,5	5	**
19	4,2	4,2	4,2
20	4,6	4,1	3,8
21	4,9	3,8	3,9
22	4,1	3,9	**
23	4,4	4,2	4,5
24	0,8	4,8	**
25	4,6	4,8	**
26	3,9	4,2	3,3
27	3,7	3,7	4,1
28	3,9	4,5	**
29	5	4,2	4,3
30	3,7	4,2	**
31	4	3,9	**
32	4	**	**
33	3,5	**	**
34	4	4,6	**
35	2,6	4	**
36	3,6	**	**
37	3,2	**	**
38	3,4	4,2	**
39	4,1	**	**
40	3,8	**	**
41	5,4	**	**
42	3,7	**	**

Valor de referência: 3,5 a 5,0 g/dl

M1=antes do tratamento; M2= aos três meses; M3= ao final do tratamento anti-tuberculose.

** dado não disponível.

Anexos



Anexo 1



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 05 de dezembro de 2.005

OF. 430/2005-CEP

*Ilustríssima Senhora
Prof.^a Dr.^a Jussara Marcondes Machado
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Dr.^a Jussara,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Avaliação do tratamento anti-tuberculose, pela determinação do perfil de citocinas e do fator de crescimento endotelial vascular", de autoria de Sônia Maria Usó Ruiz Silva, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05 de dezembro de 2.005.

Situação do Projeto: APROVADO.

Atenciosamente,



*Alberto Santos Capellupi
Secretário do CEP*

Anexo 2

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU – FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE DOENÇAS TROPICAIS E DIAGNÓSTICO POR IMAGEM
Botucatu-SP Distrito de Rubião Júnior CEP 18618-000 PBX (014) 8212121 R: 2212 FAX (014) 8212711

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A tuberculose atinge cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo. A bactéria que causa a doença sai do doente quando ele tosse, fala ou espirra contaminando outras pessoas. O diagnóstico é feito pelo exame de escarro ou raio-x de pulmão. Com o tratamento, o doente fica curado. Assim, é importante acompanhar esse tratamento para ver como o paciente está reagindo.

Nesta pesquisa, denominada “**Avaliação do tratamento anti-tuberculose, pela determinação do perfil de citocinas e do fator de crescimento endotelial vascular**”, vamos estudar substâncias do sangue, que estão aumentadas antes do tratamento, mostrando que a doença está em atividade, e vão diminuindo à medida que o doente vai se curando. Assim podemos saber se o tratamento está fazendo o efeito desejado.

Para isso, é necessário colher 20 ml (2 colheres de sopa) de sangue, antes do início do tratamento, no 3º e 6º mês de tratamento da tuberculose, com material estéril e descartável, no local onde os pacientes normalmente são atendidos para o diagnóstico da doença.

Tendo sido satisfatoriamente informado sobre o projeto, sob a responsabilidade da biomédica Sônia Maria Usó Ruiz Silva e da médica Dra Jussara Marcondes Machado do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da UNESP de Botucatu, declaro que concordo em participar do mesmo.

Sei que a participação no estudo não trará risco algum para minha saúde, pois a quantidade de sangue necessária para realizar os testes é pequena, e o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. Também estou ciente de que os resultados dos exames serão utilizados somente pelas pesquisadoras, que estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sei, ainda, que poderei retirar este consentimento a qualquer tempo, sem que isso prejudique futuros atendimentos em qualquer dependência desta unidade.

Assinatura do paciente ou responsável

DECLARAÇÃO:

Declaro que o presente projeto de pesquisa foi explicado em detalhes ao paciente Sr.(a) _____

Assinatura da biomédica responsável pela explicação.

Sônia Maria Uso Ruiz Silva
Rua Joaquim Fidelis 7-65 Vila universitária
CEP: 17012-180 – Bauru-SP
Fone(14) 3103-5873

Bauru, de 2005

Anexo 3

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU – FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE DOENÇAS TROPICAIS E DIAGNÓSTICO POR IMAGEM
Botucatu-SP Distrito de Rubião Júnior CEP 18618-000 PBX (014) 8212121 R: 2212 FAX (014) 8212711

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Para o Grupo Controle

Você está sendo convidado a participar, como Grupo Controle de indivíduos normais, do projeto de pesquisa: “**Avaliação do tratamento anti-tuberculose, pela determinação do perfil de citocinas e do fator de crescimento endotelial vascular**”. Nesse projeto, vamos estudar proteínas do sangue, que têm valores altos antes do tratamento, mostrando que a doença está em atividade, e vão diminuindo à medida que o doente vai se curando. Assim podemos saber se o tratamento está fazendo o efeito desejado.

Necessitamos de indivíduos saudáveis, como é o seu caso, para podermos comparar os valores das proteínas encontradas no seu soro com o dos pacientes.

Para isso, é necessário colher 20 ml (2 colheres de sopa) de sangue, uma única vez, com material estéril e descartável.

Tendo sido satisfatoriamente informado sobre o projeto, sob a responsabilidade da biomédica Sônia Maria Usó Ruiz Silva e da médica Dra Jussara Marcondes Machado do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da UNESP de Botucatu, declaro que concordo em participar do mesmo.

Sei que a participação no estudo não trará risco algum para minha saúde, pois a quantidade de sangue necessária para realizar os testes é pequena, e o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. Também estou ciente de que os resultados dos exames serão utilizados somente pelas pesquisadoras, que estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sei, ainda, que poderei retirar este consentimento a qualquer tempo, sem que isso prejudique futuros atendimentos em qualquer dependência desta unidade.

Assinatura do paciente ou responsável

DECLARAÇÃO:

Declaro que o presente projeto de pesquisa foi explicado em detalhes ao paciente
Sr.(a) _____

Assinatura da biomédica responsável pela explicação.

Sônia Maria Uso Ruiz Silva
Rua Joaquim Fidelis 7-65 Vila universitária
CEP: 17012-180 – Bauru-SP
Fone(14) 3103-5873

Bauru, de 2005

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)