



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



EVELIN SANTOS OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Potenciais marcadores de proteção para avaliação de
estratégias vacinais contra Tuberculose.**

SALVADOR - BAHIA

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



EVELIN SANTOS OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Potenciais marcadores de proteção para avaliação de
estratégias vacinais contra Tuberculose.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Imunologia como requisito para
obtenção do título de **mestre** em
Imunologia.

Orientadora: Theolis Barbosa

Co-orientador: Sérgio Arruda

SALVADOR – BAHIA

2008

EVELIN SANTOS OLIVEIRA

**POTENCIAIS MARCADORES DE PROTEÇÃO PARA ESTRATÉGIAS
VACINAIS CONTRA TUBERCULOSE.**

Esta dissertação de mestrado foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Imunologia** pela Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia.

Salvador, 16 de dezembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

Adelmir Macado

Lourdes Farré

Orientadores da dissertação de mestrado:

Theolis Costa Barbosa Bessa

Sérgio Arruda

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Theolis Barbosa, pelo convite, quando ainda fazia graduação, para fazer parte deste projeto. Por ter confiado em mim e ensinado com tanta paciência os segredos da imunologia, e principalmente, por fazer do ambiente de trabalho, um lugar prazeroso de se conviver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Vanda e Elício, pelo carinho e por terem sido meus primeiros financiadores, sem precisar submeter projetos para ter seu apoio incondicional.

Aos meus irmãos e amigos pelos necessários momentos de descontração e alegria.

A Eduardo, meu esposo, que significa meu cantinho seguro, onde buscamos juntos participar do crescimento um do outro e dessa forma tudo fica mais fácil.

Aos voluntários que aceitaram participar do estudo.

Ao PPGIM, em especial à Dilceia, Prof^a Songeli Freire, Maria de Fátima Dias Costa e Prof^o Roberto Meyer.

Aos colegas, em especial a Luciana Aragão, Sandra Dorea, Patrícia Cisneiros e Marcos Herculano.

Ao LIMI-FIOCRUZ/Ba, coordenado por Dr. Barral. A Jorge Tolentino e Nátali Cerqueira, que sempre me ajudaram e são a alegria do laboratório. A Gilvaneia Santos, George, Johan Van Weyenbergh, Jorge Clarêncio pela amizade e apoio com citometria, reagentes ou sugestões de trabalho.

Aos participantes do Projeto BCG, dentre eles, Maurício Cardeal, pela ajuda com as análises estatísticas, Dr. Jamocyr, Régis e Francisco Sampaio pelas colaborações e aos meus amigos Jaqueline Soledade, Elisabete Conceição, Maurício Pedrosa, Iukary Takenami, Tonya Duarte, Joilda Nery, Cleriston Farias.

A Dr. Adelmir Machado e Dra. Lourdes Farré pelas importantes críticas e sugestões ao trabalho.

Ao Dr. Sérgio Arruda pelos ensinamentos, conselhos, reclamações e piadas na hora do cafezinho.

À Dra. Theolis Barbosa, que mesmo a distância, foi uma orientadora presente. Por indicar o melhor caminho, sem percorrê-lo para mim. Pela amizade e madrugadas de CBA regado a chocolate, pipoca e café.

A Deus, por ter colocado em minha vida, todas essas pessoas citadas acima.

RESUMO

Introdução. A tuberculose (TB) é uma doença crônica infecto-contagiosa, presente nos principais casos de morbidade-mortalidade nos países em desenvolvimento. Estima-se que 2 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e cerca de 10% destes tem risco de desenvolver a doença. Desde 1921, a única vacina utilizada contra tuberculose é o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) e mesmo com o uso, a TB ainda é uma das principais causas de morte por agentes patogênicos. A imunidade celular adquirida após vacinação com BCG é mais efetiva contra a infecção disseminada do que contra a doença pulmonar. São poucas as pesquisas que avaliam a resposta a revacinação e geralmente esses estudos são de acompanhamento ou abrange pequeno número de voluntários. A pesquisa de novas vacinas vem sendo comprometida pelas poucas correlações da imunidade protetora, por isso, a avaliação de marcadores que possam correlacionar com a proteção contra a doença pode facilitar a identificação de novos candidatos vacinais contra TB. **Objetivo.** Neste trabalho, nós avaliamos a produção de citocinas potencializadoras da resposta imune celular, nomeadamente o IFN- γ e o TNF, a produção de citocinas modulatórias como a IL-10 e a geração de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ como potenciais marcadores imunológicos de proteção contra a TB. **Metodologia.** Voluntários entre universitários da área de saúde, submetidos ao teste tuberculínico (TST), e que foram previamente vacinados com BCG. Após consentimento informado, voluntários TST negativos foram divididos em dois grupos: 50 estudantes foram revacinados com BCG e 30 foram controles. Foram coletados vinte mililitros de sangue nos tempo 0, 2 e 12 meses após revacinação. As culturas foram mantidas por 72h com ou sem 10 ug/ml de antígenos do lisado de *Mycobacterium tuberculosis* a 37⁰C, 5% CO₂. Os sobrenadantes foram avaliados para medir os níveis de citocinas usando citometria de fluxo bem como as frequências de células TCD8⁺IFN- γ ⁺. **Resultados e discussão.** Foram observados aumento dos níveis de IFN- γ nos revacinados quando comparados aos controles 2 meses e 1 ano após a intervenção, semelhantes aos resultados encontrados em trabalho anterior do grupo. Não foram observadas diferenças entre o produção de TNF e IL-10 entre os grupos. Indivíduos do mesmo grupo revacinado apresentaram melhor resposta à revacinação, observados através da alta produção de IFN- γ e expansão de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ um ano pós-BCG, mostrando também, persistência da resposta. Houve pequena correlação entre tamanho da cicatriz e expansão de células TCD8⁺ produtoras de IFN- γ ⁺. **Conclusão.** A revacinação é capaz modular a resposta imune aumentando a produção de IFN- γ . Neste trabalho, ainda identificamos a persistência da resposta através da expansão de células TCD8⁺ produtora de IFN- γ . Sugerimos que novos modelos vacinais sejam desenvolvidos levando em consideração o importante papel das células CD8⁺IFN- γ ⁺, além do conhecimento de que a resposta é diferenciada na população, portanto, é necessário desenvolver uma vacina que possa abranger indivíduos com infecção latente, já sensibilizados anteriormente com cepa vacinal ou micobactérias atípicas ou ainda com alguma suscetibilidade genética.

Palavras-chaves: *Mycobacterium tuberculosis*, vacina BCG, revacinação, citocinas, IFN-gama, células CD8, tuberculose.

ABSTRACT

Introduction. Tuberculosis (TB) is a chronic, infectious and contagious disease, present in most of morbidity and mortality cases in developing countries. It is estimated that 2 billion of people worldwide are infected with *Mycobacterium tuberculosis* and about 10% of that has a risk of developing the disease. Since 1921 the only vaccine against tuberculosis is the use of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and even with the use of this vaccine TB is still the major cause of deaths from pathogens. The acquired cellular immunity after vaccination with BCG is more effective against spread infection than against lung disease. There are few studies that evaluate the response to revaccination, generally these studies are follow-up or cover small number of volunteers. The research concerning new vaccines has been hampered by low correlations of protective immunity so the evaluation of markers that may correlate with protection against disease may facilitate the assessment of new vaccine against TB. **Objective.** In this study we evaluated the production of enhanced cytokines from the cellular immune response IFN- γ e o TNF the production of cytokines such as IL-10 and the production of TCD8+IFN- γ ⁺ cells as markers for immunological protection against the TB. **Methods.** Volunteers were recruited among university students of health care areas; they were all submitted to the tuberculin skin test (TST) and were previously vaccinated with BCG. After consent, volunteers with negative TST were divided into two groups: 50 students were revaccinated with BCG and 30 were controls. Twenty milliliters of blood were collected in 0, 2 and 12 months after revaccination. The cultures were kept for 72 hours with or without 10 ug/ml of lysate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* at 37⁰C, 5% CO₂. The supernatants were assessed to measure the levels of cytokines using flow cytometry and frequency of cells TCD8⁺IFN- γ ⁺. **Results and Discussion.** Was observed that levels of IFN- γ increased in revaccination when compared to controls with 2 months and 1 year after intervention, similar to results in previous work of the group. There were no differences between the production of TNF and IL-10 between groups. Revaccinated individuals of the same group showed better response to its revaccination, observed by a high production of IFN- γ and expansion of cells TCD8⁺IFN- γ ⁺ one year post-BCG, showing also persistence of the response. There was little correlation between the size of the scar and expansion of TCD8⁺ who produces IFN- γ . **Conclusion.** The revaccination is able to modulate immune response by increasing the production of IFN- γ . In this study was also identified the persistence of response through the expansion of TCD8⁺ who produces IFN- γ . We suggest that new vaccine should be developed taking into consideration the important role of CD8⁺IFN- γ ⁺ cells. Beyond the knowledge that the answer is different in population, so it is necessary to develop a vaccine that could include individuals with latent infection, previously sensitized with strain vaccine or atypical mycobacteria or even with some genetic susceptibility.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, BCG vaccine, revaccination, cytokines, IFN-gamma, CD8 cells, tuberculosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativa do número de novos casos de tuberculose, por país, 2006.	25
Figura 2. Principais características da tuberculose: da infecção a defesa do hospedeiro.	28
Figura 3. Preparação das diluições do padrão para análises de citocinas.	43
Figura 4. Produção de IFN- γ em culturas de sangue total de voluntários em meio sem estímulo, estimulado com antígeno micobacteriano (Mtb) ou antígeno não relacionado (Derp).	45
Figura 5. Análise por citometria de fluxo de células TCD8 ⁺ IFN- γ ⁺ .	48
Figura 6. Fotografias da lesão vacinal dos voluntários revacinados com BCG.	56
Figura 7. Produção de citocinas em culturas de sangue total de voluntários revacinados ou controles com ou sem estímulo por antígeno micobacteriano (MtbAg), dois meses após a primeira coleta.	60
Figura 8. Produção de citocinas em culturas de sangue total de voluntários revacinados e controles, nos tempos zero e dois meses após a primeira coleta.	61
Figura 9. Correlações entre níveis de citocinas em culturas de sangue total de voluntários revacinados e controles, no tempo de dois meses.	62
Figura 10. Produção de IFN- γ em culturas de sangue total estimuladas com MtbAg, nos tempos zero e dois meses após a primeira coleta, nos subgrupos com alta responsividade e com baixa responsividade.	63
Figura 11. Produção de IFN- γ em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, dois meses após a primeira coleta, nos subgrupos com alta responsividade e com baixa responsividade.	64
Figura 12. Correlações entre níveis de citocinas em culturas de sangue total de voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade, no tempo de dois meses.	65
Figura 13. Correlação entre níveis de TNF e IL-6 entre indivíduos com alta responsividade e com baixa responsividade.	65

Figura 14. Avaliação da produção de IFN- γ em culturas de sangue total de indivíduos revacinados com BCG e controles, nos tempos zero, dois meses e 12 meses após a primeira avaliação.	67
Figura 15. Avaliação dos níveis de IFN- γ nos tempos zero, dois meses e doze meses após revacinação com BCG.	68
Figura 16. Produção de IL-10 em culturas de sangue total estimuladas com antígeno.	69
Figura 17. Correlações entre níveis de citocinas em culturas de sangue total de voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade na análise de um ano pós-BCG.	69
Figura 18. Expansão dos linfócitos T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ em culturas de sangue total nos tempos zero, dois meses e doze meses após a primeira avaliação.	70
Figura 19. Razão entre a proporção de células T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ em culturas de sangue total nos tempos dois meses e doze meses após a primeira avaliação e a proporção de células T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ no tempo zero.	71
Figura 20. Avaliação da correlação entre o tamanho da cicatriz (em cm) formada dois meses após a revacinação e a proporção de células CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	72
Figura 21. Análise da cicatriz e da lesão pós-vacinação.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Características sócio-demográficas da população do estudo e exposição ao <i>M. tuberculosis</i> .	50
Tabela 2 – Total de perdas de voluntários que não retornaram para leitura do primeiro teste tuberculínico ou que não retornaram para aplicação e leitura do segundo TST durante o estudo, descrito entre os cursos e entre sexo.	51
Tabela 3- Características sócio-demográficas e exposição ao <i>M. tuberculosis</i> entre os voluntários dos grupos revacinado e controle.	54
Tabela 4 – Características da lesão vacinal dos voluntários que compareceram na primeira semana após a revacinação e o acompanhamento após um e dois meses.	55
Tabela 5- Valores do hemograma obtidos a partir da média dos exames da coleta sanguínea realizada no tempo 0, após 2 meses e 1 ano da revacinação.	57
Tabela 6- Produção de citocinas no sobrenadante de culturas de sangue total cultivadas com estímulo de antígeno total lisado do <i>M.tuberculosis</i> e sem estímulo, no tempo zero.	59
Tabela 7 – Avaliação de citocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, 2 meses pós-BCG, para os voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade .	64
Tabela 8- Avaliação da produção de citocinas em culturas de sangue total, estimuladas ou não com antígeno (MtbAg), um ano após a primeira avaliação, para voluntários revacinados e controles.	66
Tabela 9- Avaliação da produção de citocinas em culturas de sangue total estimuladas ou não com antígeno, para voluntários revacinados e voluntários controles, nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e um ano (T12) após a primeira avaliação.	67
Tabela 10. Avaliação da produção de citocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, no tempo de 12 meses pós-BCG, para voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade.	68
Tabela 11. Expansão <i>in vitro</i> dos linfócitos T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ por estímulo com antígeno em culturas de sangue total de indivíduos com alta responsividade e com baixa responsividade nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e um ano (T12) pós-BCG.	71

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Seleção e perdas de voluntários durante a fase de aplicação e leitura do teste tuberculínico e coleta sanguínea, nos tempos 0, após 2 meses e após 1 ano da primeira coleta. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CBA – *Cytometric Bead Array*

DERPAg – Antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus*

DTH - *Delayed-type hypersensitivity*

ESAT-6 – Early secreted antigenic target – 6

FBDC – Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

IFN- γ - Interferon- γ

IL – Interleucina

MHC - *Major histocompatibility complex*

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

MtbAg- Antígeno do *Mycobacterium tuberculosis*

NO – *Nitric oxide*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PPD - *Purified Protein Derivative*

RNI – *Reactive nitrogen intermediates*

ROI - *Reactive oxygen intermediate*

TB – Tuberculose

Th – T helper

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TST- *Tuberculin skin test*

UFBa – Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 TUBERCULOSE: AGENTE ETIOLÓGICO E PATOGÊNESE	14
1.2 DESENVOLVIMENTO DA VACINA BCG	18
1.3 ESTUDOS SOBRE A EFICÁCIA DA VACINAÇÃO	20
1.3.1 Estudos sobre a eficácia da revacinação	22
1.4 RESPOSTA IMUNE A VACINA BCG	24
1.5 TUBERCULOSE COMO UM PROBLEMA CONTEMPORÂNEO	25
1.6 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO CONTRA O <i>M.tuberculosis</i>	27
1.6.1 Papel dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ efetores essenciais na resposta contra o bacilo	29
1.6.2 Produção de citocinas na infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. JUSTIFICATIVA	36
4. ABORDAGEM METODOLÓGICA	38
5. RESULTADOS	49
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9. ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença crônica infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e continua sendo um sério problema de saúde pública. O aumento do número de casos em países desenvolvidos, principalmente relacionados à co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida e/ou a cepas resistentes às drogas antituberculosas, tem estimulado estudos sobre desenvolvimento de novas vacinas, marcadores de proteção, novos métodos de diagnósticos e drogas mais efetivas e menos tóxicas para o tratamento (MOURA *et al.*, 2004; NABESHIMA *et al.*, 2005). Quando a tuberculose ativa se desenvolve, a localização da doença, sua severidade e prognóstico são altamente variáveis, por isso a necessidade de se investir em profilaxia e tratamento. O sistema imune possui mecanismos eficientes para conter o bacilo, mas muitas vezes falha na proteção e a vacina utilizada atualmente tem sido motivo de discussão (CREVEL *et al.*, 2002).

1.1 TUBERCULOSE: AGENTE ETIOLÓGICO E PATOGÊNESE

O surgimento da família *Micobacteriaceae* antecede a evolução da vida animal e compreende diversas bactérias saprófitas do solo, que desempenham a função de decompor material vegetal morto. O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto das subespécies *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.microti* e *M.africanum*. As deleções genômicas no *M.bovis* sugerem que não seja o precursor evolucionário do *M.tuberculosis*, sendo contra a idéia de que a tuberculose humana foi originada pela domesticação de gados (CAMPOS *et al.*, 1999; MOSTOWY *et al.*, 2002; STEAD *et al.*, 1990; STEELE *et al.*, 1958).

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo aeróbio facultativo, patógeno intracelular que tem predileção pelo tecido do pulmão rico em suplemento de oxigênio. Mede de 1-4µm, é freqüentemente irregular devido aos vacúolos e grânulos polifosfatídicos, e cultivado *in vitro* suas colônias podem ser visíveis após 3 a 6

semanas (SALGAME, 2005; SKEIKY *et al.*, 2006). O envelope da parede celular é rico em cera e lipídios, especialmente o ácido micólico, sendo importante fator de virulência, e contribui para evasão ou subversão da resposta efetora do hospedeiro e resistência aos antibióticos (KWON, 1995).

As manifestações clínicas da doença resultam de uma complexa interação entre o bacilo invasor e o hospedeiro. Apesar da descoberta do agente causador da tuberculose ter se dado há mais de cem anos, não foi possível eliminar ou diminuir o número de indivíduos infectados pelo bacilo. A doença continua infectando e matando muitas pessoas, principalmente em países em vias de desenvolvimento (CREVEL *et al.*, 2002; SCHLUGER *et al.*, 2005). Nos países mais desenvolvidos, o impacto da doença sobre a população foi reduzido pelas melhorias nas condições de vida que ocorreram em meados do século XIX, além da implementação da quimioterapia efetiva nos últimos 50 anos. Nos países em desenvolvimento, ao contrário, a tuberculose manteve-se como um sério problema de saúde pública (WHO, 2007).

Em 1868, o médico francês Jean-Antoine Villemin, publicou um estudo intitulado “*Etudes sur la Tuberculosis*” (Estudos sobre a tuberculose), no qual estabeleceu a natureza da infecção tuberculosa em experimentos animais, demonstrando a via de transmissão da tuberculose, mas não identificou o agente causador. Esta descoberta foi realizada por Robert Koch, que a anunciou em um Congresso da Sociedade de Fisiologia de Berlim em 24 de março de 1882 (SCHLUGER *et al.*, 2005). Com base nas suas descobertas sobre o modo de disseminação da doença, recomendou o isolamento dos pacientes com tuberculose. Muitos anos após identificar o *Mycobacterium tuberculosis* como o microorganismo responsável pela doença, Koch descobriu uma substância feita a partir do sobrenadante do crescimento em caldo do *M.tuberculosis* e hoje nós a conhecemos como tuberculina. Com seu uso Koch demonstrou pela primeira vez a resposta imune aos produtos do bacilo, mediada por células que influenciam nas manifestações clínicas da tuberculose (SCHLUGER *et al.*, 2005).

O teste de Mantoux foi desenvolvido a partir do lisado do *M.tuberculosis*, também chamado de Derivado Proteico Purificado (PPD), apresentando uma clássica resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) verificada após a injeção subcutânea. O PPD é composto de antígenos solúveis derivados do *Mycobacterium*

tuberculosis (Mtb), degradados por processo de inativação pelo calor aplicado em caldo de cultura. A preparação do filtrado de cultura contém proteínas liberadas durante a primeira fase de crescimento da micobactéria na cultura. O filtrado de cultura do Mtb compreende mais de 100 proteínas, com múltiplos antígenos imunoprotetores e possíveis candidatos vacinais (WEIR *et al.*, 2008).

O teste tuberculínico é usado em todo o mundo para verificar a infecção pelo bacilo. Já se sabe que a especificidade e sensibilidade deste teste difere entre as populações, devido a variação na exposição a micobactérias ambientais, à vacinação com BCG, e também pelo fato de alguns indivíduos infectados não apresentarem reação (SALLES *et al.*, 2007; SKEIKY *et al.*, 2006; WEIR *et al.*, 2006). A endureção no local de aplicação da tuberculina pode ser medida de 48 a 72 horas após a aplicação do PPD. Esse endurecimento e vermelhidão no local ocorre pela migração de células e dilatação dos vasos sanguíneos (VUKMANOVIC *et al.*, 2006). A sensibilidade tuberculínica forte (>10 mm de diâmetro de induração no teste de Mantoux com 2 unidades de tuberculina em presença de Tween 20), é altamente sugestivo de infecção e grande risco de ter a doença, enquanto que níveis baixos de reatividade (0-4 mm) estão associados com baixo risco de ter a doença. O teste tuberculínico auxilia no diagnóstico da infecção, sendo necessários outros exames para confirmação da doença, como a radiografia do tórax, a baciloscopia e a cultura. Muitos estudos apontam reação cruzada a antígenos presentes no PPD em indivíduos expostos a micobactérias ambientais ou infectados por micobactérias atípicas, bem como em indivíduos vacinados com BCG, tanto em humanos como em modelos animais (SKEIKY *et al.*, 2006; WEIR *et al.*, 2006).

O teste tuberculínico em funcionários da área de saúde ou contactantes de indivíduos com tuberculose pode ser negativo em uma avaliação inicial e ter o resultado alterado após segunda aplicação do PPD. Acredita-se que este efeito, denominado efeito *booster*, evidencie uma resposta de memória previamente estabelecida pela infecção com o *M.tuberculosis* ou pela vacinação com a BCG, ou ainda, devido a uma nova infecção com *M.tuberculosis*. Por isso, alguns centros de saúde em locais com alta prevalência de tuberculose utilizam duas aplicações do teste (SALLES *et al.*, 2007).

Novos métodos vêm sendo desenvolvidos para substituí-lo, como por exemplo, técnicas que avaliam a produção de IFN- γ *in vitro* por células do sangue periférico

estimuladas por antígenos do *M. tuberculosis* (Interferon-gamma release assay-IGRA). Atualmente há dois tipos principais de testes que avaliam infecção micobacteriana: o QuantiFERON-TB Gold[®] (Cellestis, Carnegie, VIC, Austrália) e o T-SPOT[®] (Oxford Immunotec, Oxford, Inglaterra). Estes testes não são afetados pela vacinação BCG nem pela exposição a micobactérias atípicas e podem ser mais específicos do que o TST, pois utilizam antígenos não encontrados nestas micobactérias, como por exemplo o ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target - 6kDa), proteína secretada pelo *M.tuberculosis*, à qual reagem principalmente os indivíduos com tuberculose ativa ou contactantes infectados com Mtb. Contudo, os altos custos tanto das instalações laboratoriais quanto do kit podem limitar a adoção dessas técnicas (FARHAT *et al.*, 2006). Além de teste diagnóstico, o PPD é muito utilizado em experimentos laboratoriais. Por se tratar de uma mistura de antígenos solúveis do *M. tuberculosis*, podem ser utilizados para estimular células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) (CREVEL *et al.*, 2002; RAJA, 2004).

1.2 DESENVOLVIMENTO DA VACINA BCG

A cepa do *Mycobacterium bovis*, causa da tuberculose bovina, foi primeiro isolada por Nocard em 1908. Só em 1921, a vacina BCG foi criada por Albert Léon Charles Calmette e Jean-Marie Camille Guérin do Instituto Pasteur, em Lille na França (HAWGOOD *et al.*, 1999). O desenvolvimento da vacina Bacilo Calmette-Guérin (BCG), foi realizada através da atenuação *in vitro* de uma amostra virulenta do *Mycobacterium bovis* após 13 anos de sucessivas culturas em meio contendo fécula de batata e bile. Com a cultura submetida por este tempo fora do ambiente de um hospeiro, as cepas foram perdendo genes importantes de virulência, responsáveis pela patogenicidade do bacilo. A atenuação da BCG foi acompanhada pela perda de 130 genes, entre os quais não somente genes relacionados à virulência, como também antígenos importantes para vacinação. Estes antígenos são hoje considerados potenciais candidatos vacinais a fim de suplementar a vacina BCG. A passagem por culturas sequenciais para sua difusão em escala mundial, causou oito mutações genéticas num período de 40 anos (BARRETO *et al.*, 2006; BENÉVOLO-DE-ANDRADE *et al.*, 2005).

Mesmo com o uso da BCG, a tuberculose ainda é uma das principais causas de morte por agentes patogênicos (BLACK *et al.*, 2001; WORKU *et al.*, 2000). A cepa atualmente utilizada no Brasil foi trazida do Instituto Pasteur na França para o Uruguai pelo médico Dr. Julio Elvio Moreau em 1925, e difere por duas mutações daquela entregue ao Dr. Arlindo de Assis, no Rio de Janeiro, em 1927, que foi chamada de cepa Moreau-Rio de Janeiro. A vacina BCG é atualmente produzida em muitos laboratórios em todo o mundo e no Brasil a Fundação Atauilpho de Paiva é responsável pela produção, enquanto que o Instituto Nacional de Controle de Qualidade fiscaliza cada lote conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS). A atenuação do *M.bovis* em diferentes locais não forneceu cepas idênticas, devido à variabilidade biológica das cepas iniciais, que apresentavam diferentes características genótípicas e fenotípicas. Como resultado, as cepas vacinais diferem na viabilidade, imunogenicidade e virulência residual. Comparada com as cepas Paris, Gothenburg, Copenhagen,

Moscú, Tóquio, Londres e Praga, a cepa Moreau-Rio de Janeiro mostrou baixa virulência em experimentos animais, e entre as crianças, uma baixa severidade de lesões dérmicas, produzindo uma resposta mais intensa e duradoura (GRANGE *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2007; STARK *et al.*, 2004).

Em muitos países a vacinação com BCG é recomendada em crianças menores de cinco anos em um volume de 0,1ml na inserção inferior do músculo deltóide direito, e na maioria das vezes provoca uma cicatriz, que pode ser reconhecida por sua localização e aparência. Em muitos estudos a diferenciação entre indivíduos vacinados e não vacinados ocorre pela presença ou ausência da cicatriz (MALUCELLI *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007). Alguns pesquisadores defendem a idéia de que a falta de cicatriz da BCG pode significar falha na resposta protetora da vacina e esse fenômeno é chamado de reação abortiva, neste caso é recomendado a revacinação (AGARWAL *et al.*, 1990; BENÉVOLO-DE-ANDRADE *et al.*, 2005; FINE *et al.*, 1989; PEREIRA *et al.*, 2003). Rani e colaboradores (1998), avaliaram crianças que não apresentavam cicatriz vacinal através de testes de inibição de migração de leucócitos *in vitro* e resposta ao PPD e verificaram que mesmo estas crianças apresentavam forte resposta aos testes, mostrando que pode haver o desenvolvimento de uma resposta imune à vacina BCG na ausência de desenvolvimento da cicatriz.

Alguns estudos avaliaram a eficácia protetora da vacina BCG não só para tuberculose, mas para tratamento de outras infecções micobacterianas, como lepra e úlcera Buruli. No Brasil, recomenda-se a vacinação/revacinação para os contactantes de pacientes com lepra (BARRETO *et al.*, 2006). Também tem sido realizadas pesquisas sobre a interferência de infecções por ancilostomídeos na resposta à vacina, além da possível redução da frequência da atopia entre as crianças vacinadas, fundamentado no fato de que a resposta Th1 promovida pela vacinação pode ser influenciada ou alterar uma resposta imune concomitante do tipo Th2 (ROTH *et al.*, 2006). Em estudos animais, a BCG teve resultado protetor contra infecções não micobacterianas, incluindo malária, salmonela e listéria (ROTH *et al.*, 2006). Desde 1976, a vacina BCG tem sido utilizada no tratamento de câncer de bexiga. A terapia com BCG intravesicular induz resposta imune local, caracterizada pela produção de citocinas, como TNF e influxo de granulócitos e células mononucleares para bexiga, o que tem mostrado bons resultados como auxiliar no tratamento (SIMONS *et al.*, 2008; HERR *et al.*, 2008).

1.3 ESTUDOS SOBRE A EFICÁCIA DA VACINAÇÃO

Existem muitos estudos sobre a eficácia da vacina e sobre a falha no controle da doença em muitas populações vacinadas. A proteção conferida pela BCG é questionável, e estudos de metanálise apontam para uma eficácia que varia de 0% a 80%, sendo que no Brasil está entre 80.2% e 88% nos casos de tuberculose extrapulmonar. Os estudos de caso-controle sobre a eficácia da primeira dose da BCG contra todas as formas de TB mostraram uma eficácia entre 16 e 73%. Em relação especificamente à tuberculose pulmonar, a taxa foi baixa, entre 10 e 66%. Os resultados mostram melhor eficácia protetora da BCG contra meningite tuberculosa e a tuberculose miliar, principalmente em crianças, e mostrou menos variabilidade, com índice superior a 50% em todos os estudos. Por outro lado, em um estudo na área rural de Guiné-Bissau, a vacinação com BCG foi associada a 45% de redução na mortalidade infantil, sugerindo que podem existir outros efeitos da vacina sobre o organismo (BARRETO *et al.*, 2005; CAMARGOS *et al.*, 1988; COLDITZ *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 1993).

Marchant e colaboradores (1999) avaliaram recém-nascidos vacinados com BCG e observaram persistência da resposta Th1 um ano após a vacinação, indicando a ativação de células de memória. A vacinação com BCG em neonatos representa um dos primeiros desafios ao sistema imune, sendo importante no desenvolvimento da resposta imune. Semelhante a esse estudo, o grupo de Hanekom (2005) fez um estudo com crianças da África do Sul para avaliar a proteção conferida pela vacina e identificou indução de células TCD8⁺ produtoras de citocinas ou citotóxicas e mostrou participação importante desta população celular na resposta a vacina, além da ativação de células T regulatórias.

Um dos grandes objetivos no desenvolvimento de modelos vacinais mais eficazes é conseguir uma resposta persistente e duradoura. Um estudo em adolescentes do Reino Unido que receberam a vacina BCG, mostrou proteção entre 50-80% contra TB pulmonar e aumento de células T específicas após estimulação com PPD e antígeno de Mtb um ano após a vacinação (SUTHERLAND *et al.*, 1987). Alguns trabalhos apontam que a primo-vacinação com BCG confere proteção por um período entre 10-15

anos (STERNE *et al.*, 1998; WEIR *et al.*, 2008), porém um estudo no Brasil aponta efeito protetor por cerca de 20 anos (BARRETO *et al.*, 2005) e numa população de índios da América do Norte, o mesmo pode chegar a 60 anos (ARONSON *et al.*, 2004). A longa resposta causada pela vacina é observada, geralmente, em populações isoladas e com baixa prevalência de tuberculose e ainda não se sabe o que leva a essa duração da resposta (BARRETO *et al.*, 2005; STERNE *et al.*, 1998).

Os estudos em áreas tropicais mostraram em geral menor eficácia protetora da BCG do que os conduzidos em regiões temperadas, o que pode estar relacionado à sensibilização a micobactérias ambientais, cerca de 100 ou mais espécies saprofíticas de micobactérias comuns no solo e em águas não tratadas, como o *Mycobacterium avium*, *M.intracellulare*, *M.fortuitum* e *M.kansasii*. Estas espécies raramente causam doença, exceto em indivíduos imunocomprometidos (FERREIRA *et al.*, 2002; NABESHIMA *et al.*, 2005; ROOK *et al.*, 2005). A resposta inapropriada seja por fatores genéticos ou pela influência ambiental pode comprometer a resposta a vacinação BCG. A sensibilização anterior com micobactérias ambientais pode levar a rápida eliminação da cepa BCG antes de gerar uma resposta protetora ou a reação cruzada pode gerar resposta do tipo Th2, influenciando negativamente na resposta da vacina. Especula-se que uma das causas que a resposta vacinal seja mais eficiente em crianças seja porque os recém-nascidos ainda não foram expostos a infecção por cepas saprofíticas (FERREIRA *et al.*, 2002; SKEIKY *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2007).

Num estudo de Black e colaboradores (2002), foram avaliados adolescentes vacinados com BCG (Cepa Glaxo) no Malawi e no Reino Unido. A população do Malawi é exposta a micobactérias ambientais e apresentou resultados mais elevados tanto de produção de IFN- γ quanto de DTH antes da vacinação, os quais não foram potencializados pela vacinação com BCG. Nos adolescentes do Reino Unido, foi observado maior aumento de IFN- γ e DTH atribuível à vacina. A exposição prévia observada nos adolescentes do Malawi pode ser uma das principais causas da falha da vacina (CHILIMA *et al.*, 2006).

Young e colaboradores (2007), sugeriram que a falha de alguns programas de vacinação em humanos pode ser atribuído a essa reação cruzada devido ao fenótipo Th2 dominante. O estudo realizado em camundongos infectados com *M.avium* e imunizados

com BCG mostrou que nem todas as cepas são capazes de gerar reação cruzada com a vacina e ainda que esta micobactéria pode persistir no hospedeiro, interferindo na resposta imune protetora no uso de vacina micobacterianas atenuadas. Outro estudo utilizando modelo murino mostrou falha da vacina BCG por espécies de micobactérias ambientais que bloqueiam a multiplicação da BCG, fazendo com que a resposta a cepa vacinal seja rápida, impedindo a proliferação de células efetoras e posteriormente da formação de resposta de memória (BRANDT *et al.*, 2002). A grande variação da eficácia pode ser causada também pela existência de co-infecções, como no caso da infecção por helmintos; por diferenças entre as sub-cepas de BCG; por mudanças fenotípicas da vacina durante as passagens a partir da cultura original; pela mudança no processo de fabricação; por variabilidade na dose ou via de administração; pela idade da administração; e pela liofilização da vacina (SKEIKY *et al.*, 2006).

Um novo modelo de profilaxia contra a tuberculose deve ser baseado, entre outras coisas, no conhecimento da resposta imune primária que atua para proteger da doença ativa, na compreensão de como esta imunidade não é gerada eficientemente numa pequena porcentagem de pessoas que são susceptíveis à doença e pessoas com infecção latente (MOQUES *et al.*, 2001).

1.3.1 Estudos sobre a eficácia da revacinação

No Brasil, a vacinação BCG é recomendada para crianças devido a fatores como a persistência de 50/100.000 hab. de incidência da tuberculose nos últimos 10 anos e infecção por meningoencefalite tuberculosa, já em adultos por causa agravamento da epidemia tuberculose/HIV. Já a revacinação é alvo de estudos controversos. Em países com baixa incidência de tuberculose, a revacinação não é recomendada como estratégia para o controle da doença. Alguns países como Rússia e Hungria, usam repetidas doses da vacina BCG baseado no conceito de que a proteção diminui com o tempo. Na Hungria, após 1959, a revacinação foi adotada nos indivíduos maiores de 20 anos, não reatores ao PPD. Nos anos seguintes, houve diminuição da incidência de tuberculose entre as crianças revacinadas comparada com a população adulta, no qual atribuiu a

política de revacinação. Outros países recomendam a segunda dose em escolares independente da cicatriz ou PPD (Turquia, Eslováquia, República Theca, Polônia e Bulgária) (FERREIRA *et al.*, 2002; NABESHIMA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007).

No Brasil, os resultados do estudo de Barreto e colaboradores (2006) com crianças em idade escolar em duas capitais, Salvador e Manaus, mostraram que a segunda dose da BCG não teve efeito protetor contra TB pulmonar. Recentemente foi suspensa o uso da segunda dose da vacina BCG em escolares. Esta definição ocorreu após discussões no Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde. As respostas imunológicas em humanos após a vacinação com BCG são pouco compreendidas, sendo necessários estudos para elucidar questões importantes para futuras estratégias vacinais (CAMARGOS *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007).

Fjallbrant e colaboradores (2007), a fim de verificar a resposta da vacina avaliou 15 adultos vacinados e 16 revacinados em células do sangue periférico estimuladas com antígenos micobacterianos e encontrou alta produção de citocinas e ativação de células T-específicas. Nos dois grupos foi possível verificar a produção de IFN- γ e persistência mesmo após um ano e sugeriu que a prática de vacinação e revacinação nos países não endêmicos deve ser adotada com intuito de reduzir a o risco de TB. Os estudos sobre revacinação que avaliem resposta imunológica são poucos, porém, necessários para compreensão da diferença na resposta na fase adulta, idade mais afetada pela doença e com maior gravidade dos casos, e principalmente pela resposta da primo-vacinação não ter mais eficácia nesta etapa da vida.

1.4 RESPOSTA IMUNE A VACINA BCG

A eficácia protetora da BCG contra tuberculose pode diminuir com o tempo e poucos estudos avaliam a modulação que ocorre após a vacinação. Algumas razões podem explicar a diminuição da eficácia com o passar do tempo como por exemplo: redução da proteção entre os indivíduos vacinados; diminuição da suscetibilidade nos indivíduos não vacinados; mudança no balanço entre casos originários de TB progressiva, re-infecção e re-ativação (STERNE *et al.*, 1998). A resposta à vacinação em crianças recém-nascidas e adultos vacinados com uma dose de BCG é caracterizada por produção aumentada de IFN- γ , baixos níveis de IL-5 e ausência de IL-4. A vacina BCG é capaz de induzir a formação de clones PPD responsivos do tipo Th1, e portanto potencialmente capazes de promover uma resposta imune celular contra a infecção por micobactérias (MAIA *et al.*, 2006; STERNE *et al.*, 1998). Muitos estudos também apontam para importante participação das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ ou citotóxicas em culturas utilizando sangue periférico de crianças vacinadas estimulada com antígenos micobacterianos (SOARES *et al.*, 2008).

No trabalho anterior do grupo, foi demonstrada produção de IFN- γ em resposta a antígeno de filtrado de cultura de *M. tuberculosis* em culturas de sangue total de crianças de 7 a 15 anos vacinadas com BCG. A responsividade *in vitro* em termos da produção de IFN- γ foi significativamente maior entre as crianças com idade abaixo da mediana do grupo, que correspondeu a 11 anos. No mesmo trabalho, foi demonstrado que dois meses após uma dose de reforço de BCG a produção *in vitro* de IFN- γ em resposta a antígeno de *M. tuberculosis* aumentou, tanto em crianças previamente não-responsivas como em crianças que já tinham produção significativa de IFN- γ antes da revacinação (BARBOSA *et al.*, 2003).

Não existem, no entanto, estudos que comprovem a existência de uma relação direta entre a produção de IFN- γ por células do sangue periférico e proteção contra a doença tuberculosa. Outras citocinas interferem na regulação da resposta contra o bacilo e o balanço dos níveis destas citocinas pode influenciar na ativação dos macrófagos infectados e das células citotóxicas que auxiliam na destruição das micobactérias.

1.5 TUBERCULOSE COMO UM PROBLEMA CONTEMPORÂNEO

A tuberculose está presente nos principais casos de mortalidade – morbidade em países em desenvolvimento. Estima-se que 2 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas com o *M.tuberculosis* e cerca de 10% desta população tem risco de desenvolver tuberculose ativa, entre um ou dois anos após a infecção (infecção primária) ou após ter tido a doença (infecção secundária). Há estimativa de que 8,8 milhões de novos casos são notificados em todo o mundo, incluindo 3,9 milhões de diagnósticos positivos do bacilo ácido resistente no escarro e 1,7 milhão de mortes por ano (BARRETO *et al.*, 2006; KAUFMANN *et al.*, 2006; NABESHIMA *et al.*, 2005; SKEIKY *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), o Brasil ocupa o 16º lugar no número de casos, com a estimativa de novos casos em torno de 50/100.000 habitantes notificados todo ano (Figura 1). Na região Nordeste, a Bahia é o estado que possui o maior número de internações por tuberculose, com 7,2% de pacientes internados em relação ao Brasil. Na Bahia, cerca de 7.800 casos ocorrem a cada ano, com uma incidência de 60.3/100.000 habitantes. Destes, aproximadamente 3.000 casos de tuberculose ocorrem na cidade de Salvador, com incidência de 131.2/100.000 habitantes/ano (SESAB, 2008).

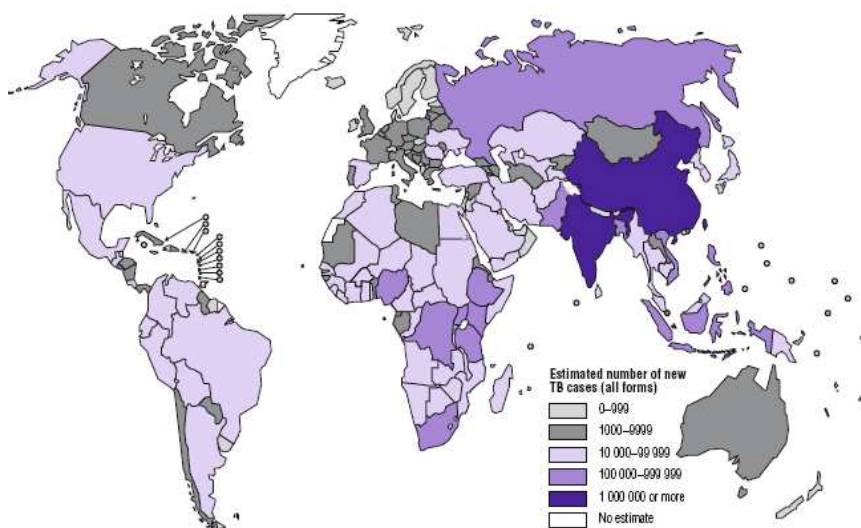


Figura 1. Estimativa do número de novos casos de Tuberculose, por país, 2006.
Fonte: WHO, 2008, p.27.

A Organização Mundial da Saúde declarou a tuberculose um problema de emergência global. Junto com a crise, veio o problema da resistência do *M.tuberculosis* a várias drogas. As principais causas para a permanência e até mesmo o aumento da tuberculose no mundo são: migração da população de áreas altamente prevalentes, a epidemia de HIV, empobrecimento de muitas populações e ambientes fechados (incluindo hospitais, prisões, casas com hospedeiros e casas pouco ventiladas com casos de doentes na residência) (BARRETO *et al.*, 2005; LEMOS *et al.*, 2004; NABESHIMA *et al.*, 2005; ROOK *et al.*, 2005). A epidemia de AIDS só agravou a situação, com aumento de 12% no número de casos da tuberculose nos países desenvolvidos (XAVIER *et al.*, 2007).

1.6 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO CONTRA INFECÇÃO PELO *M.tuberculosis*

A resposta imune impede a ocorrência de infecções disseminadas. Para a maioria das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir e impedir a progressão da infecção. Porém, as deficiências imunológicas sejam da imunidade inata ou da adaptativa, estão associadas com aumento de suscetibilidade a infecções (MACHADO *et al.*, 2004 KAUFMANN *et al.*, 2006; WEIR *et al.*, 2006).

Muitos dados epidemiológicos suportam o papel da imunidade inata na tuberculose humana (CREVEL *et al.*, 2002). Por exemplo, num estudo com enfermeiras em Arkansas-EUA, houve conversão do teste tuberculínico, ocorrendo duas vezes mais em enfermeiras negras do que nas enfermeiras brancas que foram igualmente expostas a tuberculose ativa. Aparentemente, os mecanismos de defesa da resposta inata no estágio inicial foi menos eficiente em residentes negras (STEAD *et al.*, 1990). A resposta inata pode ser importante mecanismo de defesa na fase inicial da infecção pelo bacilo e existe a possibilidade de que possa deter a infecção sem a indução da resposta adquirida (MARTINEU *et al.*, 2007) (Figura 2a). As células envolvidas na resposta inicial tem papel fundamental ao tentar impedir a instalação da micobactéria. Os fagócitos e a subsequente secreção da IL-12 são processos iniciados na ausência da exposição anterior ao antígeno, bem como as barreiras naturais associadas com as proteínas dos macrófagos (Nramp), neutrófilos, células NK e receptores Toll-Like (TLR) que reconhecem antígenos micobacterianos e ativam macrófagos e células dendríticas (LIU *et al.*, 2006; RAJA, 2004; SALGAME, 2005).

O *M. tuberculosis* é transmitido via aerossol, infecta pela via respiratória e através dos vasos linfáticos ou do sangue, migra para outras partes do corpo, como ápice do pulmão e o nódulo linfático regional, os sítios mais escolhidos. Os macrófagos apresentam uma capacidade limitada de controlar o crescimento da micobactéria que pode implicar na evolução da resposta inflamatória crônica para a necrose do tecido pulmonar, destruição tecidual e formação de cavernas pulmonares (CREVEL *et al.*, 2002; RAJA, 2004; SALGAME, 2005; SKEIKY, 2006).

A micobactéria que consegue escapar da destruição intracelular inicial se multiplica e leva a ruptura do macrófago. Os monócitos sanguíneos e outras células inflamatórias são atraídos aos pulmões através das quimiocinas. Dentro de 2 a 6 semanas de infecção, o desenvolvimento da imunidade mediada por células e o fluxo de linfócitos e macrófagos ativados dentro da lesão resulta na formação do granuloma (Figura 2).

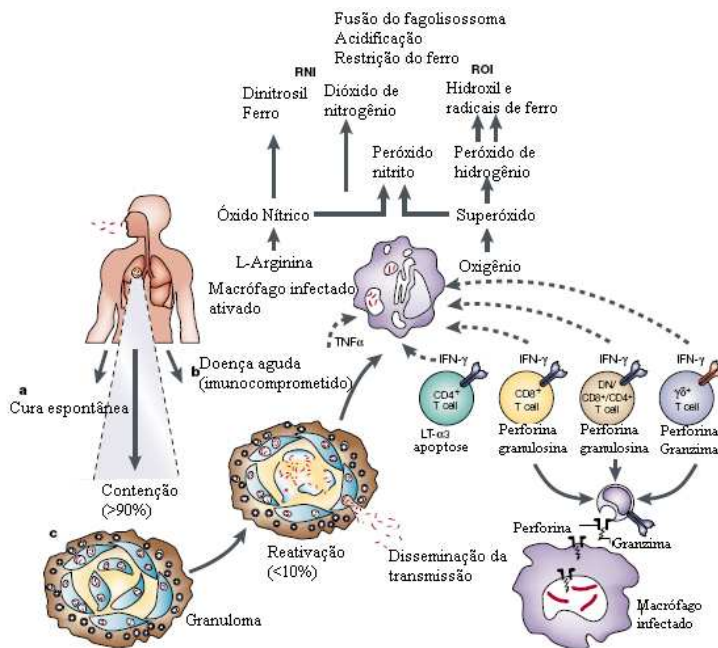


Figura 2. Principais características da tuberculose: da infecção a defesa do hospedeiro. (a) O resultado da infecção pode ser a cura espontânea, porém esta hipótese ainda é bastante estudada e ainda não reconhecida. (b) No hospedeiro imunocomprometido, a doença pode desenvolver logo após a infecção. (c) Em muitos casos, a micobactéria é inicialmente contida e a doença pode desenvolver como resultado de uma reativação. O granuloma impede a disseminação do bacilo e é formado por células T (incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺, células Tγδ, CD4/CD8 duplo negativa ou positiva que reconhecem antígeno no contexto CD1) e macrófagos que participam no controle da tuberculose. Interferon-γ (IFN-γ) e Fator de Necrose Tumoral-α (TNF- α), produzidas por células T são importantes ativadores de macrófagos. A ativação do macrófago permite a maturação do fagossoma e a produção de moléculas anti-microbianas como intermediários reativos de nitrogênio (RNI) ou intermediários reativos de oxigênio (ROI), linfotóxina-α3 (LT- α3). Fonte: KAUFMANN, 2001 adaptado.

O crescimento exponencial do bacilo é contido e a morte dos macrófagos forma o granuloma caseoso. Os bacilos são contidos, inibindo o crescimento extracelular da micobactéria, podendo ali permanecer e sendo reativado depois ou expelido pelas vias aéreas após um aumento enorme do seu número, causando necrose dos brônquios e nas cavitações. Como resultado, a infecção pode entrar numa fase estacionária ou dormente (Figura 2). A imunidade protetora e a imunidade patológica podem coexistir, pois ambas são manifestações do mesmo tipo de resposta imune específica, sendo

exemplificada nas infecções micobacterianas (CREVEL *et al.*, 2002; KAUFMANN, 2001; RAJA, 2004). Recentemente, foram descobertos genes importantes responsáveis pelo estado de latência do *Mycobacterium tuberculosis*, entre eles os genes DosR (VOSKUIL *et al.*, 2004) e o HspX sendo alvos de pesquisas em busca de desenvolvimento de novas vacinas (KAUFMANN, 2005).

O comprometimento da resposta imunológica pode resultar na re-ativação da infecção latente (SALGAME, 2005. Figura 2c). O aumento do risco de desenvolver TB em pacientes que receberam a terapia anti-TNF para doenças inflamatórias crônicas é uma evidência direta que o TNF tem um papel importante no controle da tuberculose em humanos. Alguns estudos já apontam seu papel na formação do granuloma, no qual pode regular o gradiente de quimiocinas e conseqüentemente o recrutamento de células, contribuindo para o estado dinâmico do granuloma durante a infecção latente (KAUFMANN, 2002; SALGAME, 2005).

1.6.1 Papel dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ efetores essenciais na resposta contra o bacilo

A população de células TCD4⁺ auxiliares é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: as células Th1 e Th2. As respostas destes sub-tipos celulares são antagônicas, desde que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica equilibrada (CREVEL *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2004; RAJA, 2004). As células T restringem o crescimento exponencial do *M.tuberculosis* e são responsáveis por estabelecer o nível *plateau* da carga bacteriana nos tecidos infectados. (BEVERIDGE *et al.*, 2007; KAUFMANN, 2005). O principal mecanismo de ação dos linfócitos TCD4⁺ é a produção de IFN- γ que ativa os macrófagos a fagocitarem a micobactéria interiorizada. Em estudos que utilizaram modelos murinos de tuberculose latente, a depleção de células TCD4⁺ ou de MHCII resultou na rápida re-ativação do *M.tuberculosis* e mostrou que os animais sucumbem mais rapidamente a infecção. Na falta das células TCD4⁺, os linfócitos TCD8⁺

produziram mais IFN- γ (CLIFF *et al.*, 2004; FLYNN *et al.*, 1993; MYERS *et al.*, 1999).

As células TCD8⁺ tem papel importante na resposta imune contra TB, pois são capazes de lisar células dendríticas humanas e macrófagos infectados reduzindo o número de bactérias intracelulares. A participação das células TCD8⁺ no controle da tuberculose tem sido demonstrada em estudos em camundongos e em humanos (CREVEL *et al.*, 2002; RAJA, 2004). Camundongos com deleção genética de IFN- γ , β 2-microglobulina ou outros genes envolvidos no processamento de antígenos apresentados pelo MHC I são mais suscetíveis a infecção tuberculosa progressiva e fatal. Por outro lado, camundongos com deleção genética para produção de perforina, granzima ou CD95, não estão predispostos a infecção progressiva pelo bacilo, sugerindo que em modelos murinos a secreção de citocinas ativadoras de macrófagos como IFN- γ e TNF podem ser suficientes para imunidade protetora (FLYNN *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 1999). Ngai e colaboradores (2007) utilizaram modelo murino com infecção micobacteriana pulmonar para analisar e comparar a produção de IFN- γ pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺ e verificou que a síntese de IFN- γ pelas células TCD8 é independente da ativação dos linfócitos TCD4 e na sua ausência, os níveis de IFN- γ pelos linfócitos TCD8 chega a ser três vezes mais elevada. Um outro estudo bastante interessante foi proposto por Murray e colaboradores (2006), que avaliou a resposta funcional das células TCD8⁺ em crianças vacinadas onde observou que a vacina induz a proliferação de células TCD8⁺ e produção de IFN- γ , porém em proporções menores quando comparados com as células TCD4⁺ e chegaram a conclusão que as células CD8⁺ pode contribuir para proteção induzida pela vacina.

Por outro lado, estudos que avaliam a resposta após uma segunda dose da BCG são escassos. A cepa vacinal *M.bovis* Bacilo Calmette–Guérin (BCG) e o *M.tuberculosis* são capazes de sobreviver dentro do macrófago e estimular as células TCD4⁺. A ativação de células TCD4⁺ leva à secreção de IFN- γ , que ativa os macrófagos levando à produção aumentada do óxido nítrico (NO) e destruição da bactéria. Porém, não existe a eliminação completa do bacilo e por essa razão, indivíduos em uso de corticóides e portadores de HIV podem desenvolver manifestações clínicas de tuberculose, por já terem sido infectados anteriormente e terem persistido

completamente assintomático (KAUFMANN *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2004). As respostas destas perguntas pode ajudar na compreensão da biologia das células T e no desenvolvimento de novas vacinas contra tuberculose e imunodiagnósticos que ativam linfócitos TCD8, principalmente nos indivíduos infectados com o HIV ou em pessoas com deficiências de células TCD4 (NGAI *et al.*, 2007).

1.7.2 Produção de citocinas na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*

Embora diversas citocinas com papel protetor tenham sido identificadas, a produção de IFN- γ a partir dos linfócitos T é considerada essencial. O IFN- γ é uma glicoproteína secretada principalmente pelas células TCD4⁺ e em menor proporção pelas células TCD8⁺ e células NK. Pode aumentar a apresentação de antígenos, levar ao recrutamento de linfócitos TCD4⁺ e/ou citotoxicidade dos linfócitos TCD8⁺ que participam da morte bacteriana. Defeitos nos genes humanos para receptor de IFN- γ são propensos a sérias infecções micobacterianas, contudo a produção desta citocina pode variar entre voluntários vacinados, e alguns estudos sugerem que os níveis de IFN- γ são diminuídos em pacientes com TB ativa (HOFT *et al.*, 2002 b; ROOK *et al.*, 2005). O IFN- γ age como poderoso ativador de macrófago, aumentando a expressão molecular. Estudos em camundongos depletados do gene que expressa IFN- γ demonstraram a incapacidade de eliminar a infecção causada pelo bacilo e pesquisas com indivíduos que possuem mutações genéticas nos receptores de IFN- γ mostraram alta suscetibilidade de adquirir infecções causadas por micobactérias atípicas (BLACK *et al.*, 2001; CREVEL *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2004). Desordens genéticas que afetam a síntese de IFN- γ , IL-12 e IL-23 predispõe o indivíduo a ter tuberculose severa e disseminada, não só com o *M.tuberculosis*, como também com micobactérias atípicas (ROSENZWEIG *et al.*, 2005; DOFFINGER *et al.*, 2005).

Sabe-se que o Mtb possui muitos mecanismos de escape e um deles é impedir a maturação do fagossoma e a capacidade do hospedeiro de controlar a replicação bacteriana, porém o IFN- γ pode anular esse mecanismo, modificando o nicho fagossomal pela promoção da acidificação do fagossoma e fusão do lisossoma. Em humanos, a administração de IFN- γ em pacientes com tuberculose multi-droga

resistentes com esfregaço persistentemente positivo (apesar do cumprimento adequado de um regime de antibióticos otimizado) promoveu a melhoria de parâmetros clínicos como a negatificação do escarro pela coloração de Ziehl-Nielsen e diminuição do tamanho das cavitações pulmonares (SALGAME, 2005). Weir e colaboradores (2006) avaliaram a resposta *in vitro* de IFN- γ após vacinação com BCG e observaram aumento desta citocina em adolescentes do Reino Unido (onde a vacina possui 80% de eficácia contra TB pulmonar), mas não em adolescentes do Malawi (onde a vacina é ineficaz). Estes achados indicam que a indução de resposta IFN- γ micobactéria-específica pode ser usada como um potencial marcador de proteção da imunidade.

Além do IFN- γ , outras citocinas pró-inflamatórias também participam ativamente na resposta contra o bacilo. O TNF promove a inflamação através da produção de outras citocinas, como as IL-1, IL-6 e IL-8 e pelo fator de estimulação de colônias monocíticas-granulocíticas (GM-CSF). Além disso, estimula células mesenquimatosas para liberação da matriz de metaloproteinase de destruição do tecido e leva a destruição tecidual (SICHLETIDIS *et al.*, 2006). Os efeitos do TNF sugerem que sua função pode ser dose-dependente. Camundongos deficientes de TNF ou receptor de TNF expostos a infecção por *M.tuberculosis* resulta em morte rápida, com alta carga bacteriana quando comparado ao camundongo controle. O TNF em sinergismo com o IFN- γ também induz a expressão do Óxido Nítrico Sintetase₂, (NOS₂) (CREVEL *et al.*, 2002; COWLEY *et al.*, 2003; RAJA, 2004). Novos agentes desenvolvidos que neutralizam as citocinas inflamatórias, especialmente o TNF, representam um grande avanço no controle de muitas doenças inflamatórias, como por exemplo na artrite reumatóide severa. Porém o uso do anti-TNF deve ser feito de forma racional. Um estudo realizado com pacientes com artrite reumatóide (AR) que utilizaram anti-TNF obteve melhora dos sintomas da AR, porém alguns deles desenvolveram a tuberculose ativa. Estes pacientes possuíam a forma latente, nos quais não foram diagnosticados e após a terapia com anti-TNF ocorreu a reativação da doença nas formas extra-pulmonares e disseminadas (SICHLETIDIS *et al.*, 2006). Os pacientes que necessitam fazer transplantes de órgãos também precisam ser testados para tuberculose latente, pois as drogas imunossupressoras podem ter efeitos semelhantes ao anti-TNF (TESFA *et al.*, 2004).

Outra citocina que está envolvida na resposta imune ao *M.tuberculosis* é a IL-6, com propriedades tanto pró-inflamatória como anti-inflamatória. O aumento inicial da carga de IL-6 no pulmão em camundongos sugere que seja importante na resposta inata inicial ao patógeno, mas também é encontrada no sítio da infecção. Esta citocina tem funções múltiplas na resposta imune, incluindo inflamação, hematopoiese, diferenciação e na supressão das células T (CREVEL *et al.*, 2002; RAJA, 2004). A resposta pró-inflamatória iniciada pelo *M.tuberculosis* é antagonizada pelos mecanismos anti-inflamatórios. Uma resposta pró-inflamatória incontrolada pode levar a uma destruição tecidual excessiva, enquanto que a predominância de citocinas anti-inflamatórias pode favorecer o crescimento do bacilo (CREVEL *et al.*, 2002).

A IL-10 e o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) foram identificados como as principais citocinas inibitórias da resposta celular contra o bacilo. A IL-10 antagoniza a resposta das citocinas anti-inflamatórias diminuindo a produção de IFN- γ , TNF e IL-12 (CREVEL *et al.*, 2002). Em pacientes com tuberculose progressiva, houve aumento dos níveis de IL-10 e IL-4, o que pode ser útil ao inibir progressão da doença (CREVEL *et al.*, 2000; ROOK *et al.*, 2004). Em outro estudo, foram encontrados expressão de RNAm IL-10 em células mononucleares da circulação, no sítio da doença, no fluido pleural e alveolar (ROJAS *et al.*, 1999). Há controvérsia entre os pesquisadores sobre a produção *ex vivo* de IL-10 e seu papel regulatório na tuberculose. A função de modular a resposta imunológica pode ser importante na proteção contra o *M. tuberculosis*, ao limitar o dano tissular envolvido no desenrolar da resposta Th1, porém outros estudos apontam para possível mecanismo de evasão da micobactéria da resposta imune (MOURA *et al.*, 2004; SALGAME, 2005).

Atuando na geração da resposta imune, a IL-2 induz a expressão do *pool* de linfócitos específicos para antígenos. A expressão de IL-2 tem sido associada com as células de memória (RAJA *et al.*, 2004). O estudo de Soares *et al.* (2008), mostrou grande número de células TCD4⁺ IFN- γ estão presentes no cultivo de sangue total estimuladas com antígenos micobacterianos de crianças vacinadas, sendo possível observar a expressão aumentada de TNF e IL-2. Já os efeitos da IL-4 na infecção intracelular como na tuberculose, tem sido descrito como a citocina responsável pela supressão da produção de IFN- γ e ativação dos macrófagos. Alguns trabalhos

estabelecem um paralelo entre a presença de IL-4 e gravidade da doença tuberculosa pulmonar. A presença ou ausência da IL-4 não correlaciona com os resultados de melhorias clínicas ou diferenças nos estágios do granuloma ou na patologia (CREVEL *et al.*, 2002; RAJA, 2004). Estudo em camundongos infectados com o *M.tuberculosis* com doença progressiva e reativação da tuberculose latente mostra associação com aumento da produção de IL-4 e em humanos, ocorreu aumento da produção de IL-4 em pacientes com tuberculose, especialmente aqueles com doença cavitária. Porém, estes achado não são consistentes e o papel da IL-4 na suscetibilidade a TB não está ainda bem esclarecido (CREVEL *et al.*, 2002; ROJAS *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a evolução da resposta imune *in vitro* e *in vivo* contra antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos revacinados com BCG, para identificar parâmetros que possam ser considerados como potenciais marcadores de proteção contra a tuberculose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se existe correlação entre a produção *in vitro* de IFN- γ , TNF e IL-10 em resposta a antígenos micobacterianos em culturas de células do sangue periférico de voluntários PPD negativos após a revacinação BCG;
- Verificar se ocorre persistência da resposta de memória *in vitro* através de células TCD8⁺IFN- γ ⁺, quando os indivíduos são avaliados dois e doze meses após a vacinação
- Caracterizar dois grupos de indivíduos, com baixa responsividade ou com alta responsividade à revacinação com BCG, com base nas modificações da resposta imunológica contra antígenos micobacterianos relacionadas à produção de citocinas da resposta imune celular (Th1), humoral (Th2).

2. JUSTIFICATIVA

Assumindo um papel importante de respostas imunes de memória no controle da infecção tuberculosa, e levando em consideração o efeito protetor comprovado da vacina BCG contra formas disseminadas da TB em nosso meio, nós supomos que a revacinação com BCG deverá apresentar um efeito magnificador na amplitude de respostas imunes que estejam correlacionadas à proteção contra a tuberculose.

No Brasil a re-vacinação foi suspensa após um estudo de Barreto e colaboradores (2002) no qual mostrou falta de proteção na segunda dose da vacina. Porém, este estudo foi um estudo de acompanhamento, onde os voluntários revacinados foram acompanhados por cerca de 10 anos e identificados quem teve ou não tuberculose. Não foram realizados experimentos laboratoriais que avaliassem a modulação ocorrida após a revacinação.

Neste trabalho, nós avaliamos a produção de citocinas potencializadoras da resposta imune celular, nomeadamente o IFN- γ e o TNF, a produção de citocinas modulatórias como a IL-10 e a geração de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ como potenciais marcadores imunológicos de proteção contra a TB, observando a sua evolução após a administração de uma segunda dose de vacina em universitários da área de saúde, negativos ao teste tuberculínico e que tenham sido previamente vacinados com BCG. A seleção destes estudantes ocorreu devido a recomendação a revacinação em profissionais da área de saúde, sendo selecionados aqueles que cursavam os primeiros semestres, pois ainda não realizavam estágios curriculares em hospitais e clínicas e portanto, menos expostos a infecção pelo bacilo.

Muitos estudos em humanos utilizam a cultura de sangue total como importante ferramenta de avaliação das funções imunes, incluindo expressão de citocinas e morte bacteriana, devido simplicidade da técnica pela adição do mix de sangue heparinizado com estímulo apropriado ou agente infeccioso. A identificação de biomarcadores que correlacionem com a proteção ou patogênese é baseado no pré-requisito de que o

sangue periférico, em parte, reflete o status do combate do Mtb e do hospedeiro no pulmão (CHEON *et al.*, 2002).

4.ABORDAGEM METODOLÓGICA

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram avaliados 927 estudantes universitários de duas universidades (UFBa e FBDC) em Salvador (Universidade Federal da Bahia e Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências), cursando o 1º ou 2º semestre de cursos da área de saúde (medicina, enfermagem, fonoaudiologia, fisioterapia, farmácia, nutrição, odontologia), no período entre outubro de 2004 e maio de 2005.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os participantes do estudo foram esclarecidos verbalmente e por escrito sobre os objetivos do trabalho, sua forma de participação, possibilidades de reações adversas e complicações, procedimentos a serem seguidos nestes casos e formas de contato com o coordenador do estudo. Os voluntários recrutados no estudo tiveram a oportunidade de esclarecimento de todas as dúvidas a respeito do teste tuberculínico e revacinação com BCG e a possibilidade de apresentarem reações adversas aos procedimentos realizados no âmbito do estudo, não apenas com a equipe envolvida na coleta, como com os coordenadores do estudo e com médico pneumologista da equipe. Este último foi responsável também pela disponibilização do atendimento e acompanhamento dos voluntários recrutados em nosso estudo. Os voluntários revacinados foram acompanhados por médico dermatologista quanto a evolução da lesão revacinal, até dois meses após a revacinação. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ, Parecer nº 19/2002, ver anexo 1).

4.3 TIPO DE ESTUDO

Estudo de intervenção randomizado com coorte prospectiva.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Como critérios de inclusão adotamos: estudantes da área de saúde, cursando 1º ou 2º semestres, que concordassem com o TCLE e fizessem parte de uma das duas instituições – UFBA ou FBDC.

Como critérios de exclusão adotamos: indivíduos HIV positivo, ou que não concordassem a realização do teste.

4.5 HISTÓRICO CLÍNICO

Todos os voluntários responderam um questionário padronizado visando a avaliação de condições gerais de saúde, doenças crônicas e fatores de risco para TB (ver anexo 5).

4.6 TESTE TUBERCULÍNICO

A positividade ao teste tuberculínico foi avaliada para excluir indivíduos potencialmente portadores de infecção tuberculosa assintomática. Após o esclarecimento dos objetivos e intervenções a serem realizadas no âmbito do estudo, e uma vez obtendo a assinatura concordando com o estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, anexo), os voluntários foram submetidos a injeção subcutânea de 0,1ml de Derivado Proteico Purificado do lisado de

Mycobacterium tuberculosis (PPD RT23, cedido pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica - DIVEP), correspondente a 2 unidades tuberculínicas (TU), na porção anterior do antebraço direito. A aplicação e leitura do teste dérmico tuberculínico foram realizadas por técnicas treinadas pelo Ministério da Saúde. Foram excluídos do estudo os voluntários que apresentaram endureção com diâmetro superior a 4mm. Para os voluntários que tiveram endureção igual ou inferior a 4mm, a aplicação foi repetida transcorridos 7 a 10 dias da primeira aplicação, no antebraço contralateral. Novamente, foram excluídos do estudo os voluntários que nesta segunda aplicação apresentaram endureção com diâmetro superior a 4mm.

4.7 COLETA DE SANGUE E REVACINAÇÃO

Os voluntários negativos ao teste tuberculínico em dupla testagem foram recrutados, mediante concordância com o estudo e assinatura de novo TCLE, para o estudo de intervenção. Os voluntários codificados foram randomizados (utilizando o programa Excel, para geração de binários randômicos), para alocação no grupo a ser revacinado ou controle. Todas as coletas foram realizadas por profissionais treinados com ampla experiência. Foi realizada uma primeira coleta de sangue (tempo zero) de 20 ml de sangue em tubos a vácuo ou seringas heparinizados e 5 ml de sangue em tubo a vácuo sem anti-coagulante, após a qual, para cada voluntário, a técnica responsável pela coleta avaliou e registrou o diâmetro da cicatriz vacinal presente. Para os voluntários alocados para o grupo revacinado, a técnica treinada responsável aplicou 0,1 ml de vacina BCG subcutaneamente (Bacilo de Calmette-Guérin, cepa Moreau, fornecida pela Fundação Atilaf de Paiva ou pela Divisão Epidemiológica do SUS – Bahia), diluída no mesmo dia, segundo a técnica padrão recomendada pelo Ministério da Saúde. Esta coleta sanguínea foi repetida dois meses e um ano após a primeira coleta, para os grupos revacinado e controle.

4.8 ACOMPANHAMENTO DA LESÃO REVACINAL

Na revacinação com BCG, espera-se multiplicação limitada do bacilo na pele, induzindo estimulação da imunidade mediada por células. A avaliação, realizada por médico clínico ou dermatologista, consistiu em exame clínico e anamnese para acompanhar a evolução da lesão vacinal. A extensão da lesão (em cm) foi registrada no momento da avaliação e foram feitas fotografias para análise posterior. A cicatriz vacinal e as lesões causadas pela vacina foram avaliadas sempre pelo mesmo profissional, documentadas com fotografias e medidas com régua. Os voluntários foram questionados quanto ao uso prévio e atual de medicações, sintomas no local da aplicação ou sintomas gerais, patologias existentes e percepção da evolução da própria cicatriz.

4.9 AVALIAÇÕES IMUNOLÓGICAS:

4.9.1 Hemograma

Para realização do hemograma, foram separados 1,5ml de sangue total heparinizado devidamente identificado com o nome do projeto, coordenador do estudo, nome do voluntário, número de registro e data da coleta e encaminhado para o setor de hematologia do Laboratório Central (LACEN).

4.9.2 Teste sorológico para o vírus da imunodeficiência humana adquirida

O teste sorológico para identificação de indivíduos portadores do HIV foi realizado pelo Determine™ HIV 1/2 (Abbott Laboratories). Foi usado um teste rápido de imunoensaio qualitativo *in vitro* de leitura visual, utilizado para detecção de anticorpos contra HIV-1 e o HIV-2 em soro. Foi colocada 50µl da amostra no cartão do teste na zona absorvente a qual migra através da área do conjugado e se mistura com o conjugado de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos reservados no local de leitura do teste. Quando os anticorpos não estão presentes, o complexo de antígeno flui

e não é formada a barra vermelha. Para segurar a validade dos resultados, este ensaio possui um controle do procedimento.

4.9.3 Produção de citocinas *in vitro* em culturas de sangue total

Após a coleta e homogeneização, o sangue foi transportado ao Laboratório de Microbiologia e Imunorregulação (LIMI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz, onde foi diluído 1:10 em meio RPMI (Gibco Invitrogen) suplementado com 2mM L-glutamina (1:100 do estoque) e 40µg/ml de gentamicina (Schering Plough). O RPMI é um meio composto de sais enriquecidos que age como uma solução nutritiva sendo acrescido de glutamina, importante para enriquecimento do meio, permitindo rápida proliferação na cultura celular, enquanto que a gentamicina foi o antibiótico utilizado para evitar contaminação de bactérias ou fungos (CHEMICAL RUBBER COMPANY, 1975). Os 200 µl de sangue diluído foram colocados em cada poço em placas de 96 poços com fundo chato, e cultivado na ausência ou na presença de antígeno total lisado de *M. tuberculosis* H37Rv (10 µg/ml), obtido em colaboração com Universidade do Colorado (EUA) ou de um antígeno não relacionado (antígeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*-Derp, 25µg/ml). As culturas de sangue total foram incubadas a 37°C em incubadora de CO₂ a 5% com umidade relativa de 98%, por 72h.

Após esse período, retirou-se o sobrenadante com auxílio de pipetador. O sobrenadante dos quatro poços correspondentes foram divididos em dois *ependorfs* de 0,6ml devidamente identificados e depois, estocado no freezer a -20°C até a dosagem das citocinas pelo método citométrico multi-ensaio utilizando esferas de látex (ensaio multiplex Cytometric Bead Array– Becton-Dickinson).

4.9.3.1 Dosagem de citocinas por CBA (Cytometric Bead Array)

A dosagem das citocinas no sobrenadante foi realizada por incubação das amostras com esferas de látex contendo anticorpos específicos para as citocinas a serem dosadas, também chamadas de *beads* (anticorpos primários) e anticorpos secundários correspondentes fluoresceinados. Para este experimento foi utilizado o Kit Human Th1/Th2 Cytokine CBA da BD Biosciences para ensaio de detecção de IL-2/IL-4/IL-6/IL-10/IFN-γ/TNF.

4.9.3.2 Preparação dos padrões e mix de citocinas

No frasco contendo proteínas recombinantes humanas relacionadas às citocinas liofilizadas disponível no kit CBA, foram colocados 200µl do reagente G, um diluente composto de solução tampão, disponível no kit para obtenção de uma solução estoque 10 vezes concentrada. O padrão foi estabilizado por 15 minutos antes da diluição seriada. Após este período, foi coletado 10µl do padrão e colocado num tubo *ependorf* contendo 90µl de diluente G (figura 5). Depois, foram colocados 50µl do diluente G em 10 tubos. O tubo “*Top Standard*” (TS) recebeu além do diluente, 50µl do padrão diluído. Foi realizada então a diluição seriada, transferindo 50µl do TS para o tubo “1:2”, depois transferindo mais 50µl do tubo “1:4”, e assim sucessivamente até o tubo “1:256”, sempre homogeneizando cerca de 8-10 vezes para cada passagem. O tubo “Branco” conteve apenas o diluente e serviu como controle negativo (Figura 3).

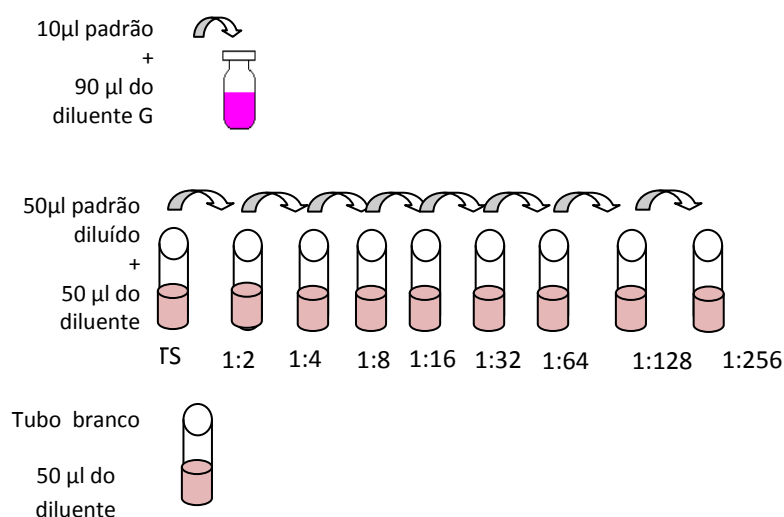


Figura 3. Preparação das diluições do padrão para análises de citocinas.

Para preparação do mix de citocinas, calculamos o número total de amostras somando com os padrões e multiplicamos por 3µl. Fizemos o vortex nos frascos contendo as *beads*, totalizando seis frascos correspondentes a IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ e TNF. Colocamos 25µl do sobrenadante diluído, 15µl do mix preparado, 18µl do reagente de detecção PE e incubamos por 3 horas à temperatura ambiente, no escuro. Durante o tempo de incubação, foram preparados os tubos utilizados para compensação. Após calibração do citômetro, adicionamos 1 ml de solução de lavagem nas amostras, fornecida pelo kit, composto por tampão de salina fosfato (PBS- phosphate buffered

saline), e centrifugamos por 5 minutos a 14.000 rpm (rotação por minuto) em microcentrífuga. Ressuspendemos em 150µl de solução de lavagem e foi realizada a leitura no citômetro de fluxo.

4.9.3.3 Aquisição e análise das amostras

As amostras foram analisadas no FACS Sort (Becton Dickinson-BD) para obtenção da intensidade média de fluorescência correspondente a cada uma das citocinas avaliadas. Estes dados foram comparados com os obtidos para uma amostra padrão, como exposto. As concentrações de citocinas nas amostras-teste foram obtidas por interpolação dos resultados de intensidade média de fluorescência, utilizando a curva-padrão (BECTON DICKINSON PROTOCOL, 2001).

As análises dos dados foi realizada pelo Software CellQuest (BD) que permite a análise rápida e multi-paramétrica, sendo as seis análises das citocinas realizadas simultaneamente para cada amostra. Os tubos de compensação são os primeiros a serem lidos pelo citômetro, sendo possível localizar a região onde serão analisadas as citocinas (gate-R1). Depois, foi feito o ajuste pelos detectores FL-2 e FL3. A partir daí, são analisadas as amostras dos padrões para geração da curva-padrão correspondente a cada citocina e só então faz-se a aquisição das amostras.

Para análise é identificada o valor da intensidade média de fluorescência de cada citocina das amostras, bem como dos padrões. Os valores das concentrações encontradas são calculadas pela diluição. Os controles negativo (sem estímulo) e positivo (antígeno Derp1) foram importantes para comparar a produção das citocinas (Figura4).

4.9.4 Ativação e marcação intracelular de sangue total

As células do sangue total estimuladas com antígeno Mtb e sem estímulo foram utilizadas para avaliar os linfócitos TCD8⁺ produtores de IFN- γ . A fileira de 12 poços foi preenchida para cada doador, com 200 µl de sangue total diluído com o RPMI por poço, com auxílio de pipeta sorológica estéril de 1ml e incubadas por 72 horas.

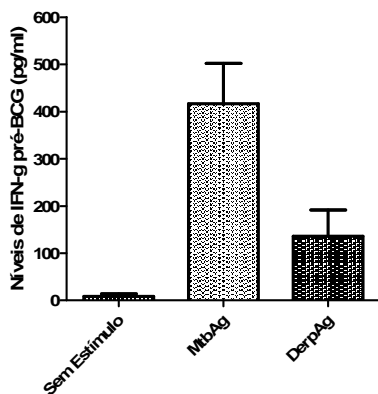


Figura 4. Produção de IFN- γ na cultura de sangue total de voluntários em meio sem estímulo (controle negativo), em meio estimulado com antígenos do lisado de *M. tuberculosis* (MtbAg) e em meio estimulado com *D. pteronyssinus* (DerpAg) usado como controle positivo.

4.9.4.1 Tratamento com Brefeldina A e marcação celular

Seis horas antes de completar o período de incubação, as culturas foram tratadas com Brefeldina A (BD) à concentração de 10 μ g/ml. A Brefeldina é uma lactona macrocíclica fúngica que provoca desarranjo do Complexo de Golgi e transporte retrógrado para o retículo endoplasmático e serve para inibir a secreção de citocinas. O controle Isotipo IgG1 κ é utilizado para avaliar o nível de marcação após fixação com paraformaldeído ou após a permeabilização com saponina. Após completar a incubação, as células das culturas foram removidas, com auxílio de pipetador, da placa para tubo falcon de 4 ml (três poços por condição). Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, a 4°C por 5 minutos, após o procedimento, o sobrenadante foi descartado.

As amostras com estímulo, sem estímulo controle positivo e controle isotipo receberam 4 μ l de anti-CD8 PerCP(*Peridinin Chlorophyll Protein*- BD/Ambriex) e 6 μ l de PBS+ BSA 1% + azida de sódio 0,02%. O PBS (*Phosphate buffered saline*) é uma solução tampão que ajuda a manter o pH constante, já a albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin –BSA) é a proteína mais abundante no plasma bovino, sendo utilizada nos experimentos com sangue total como nutriente celular e a adição de azida de sódio é importante, pois muitos reagentes contém bactérias que favorecem a contaminação e este reagente age como bacteriostático (FIGGE *et al*, 1991; SIGMA ALDRICH,2008)

No tubo compensação A, foram adicionados 8 μ l de anti-CD4 FITC /anti-CD8

PE (Cytostat- Coulter Clone) e no tubo compensação B, foram adicionados 4µl de anti-CD8 PerCP (BD- Pharmigen), a partir das células sem brefeldina. No tubo com células não marcadas não foi colocado nenhum anticorpo fluorescente. Após a adição dos reagentes, foi feito o vortex nos tubos e incubados por 20 minutos a 4°C, em ambiente escuro.

4.9.4.2 Lise e permeabilização celular

Depois do período de incubação, os tubos com células marcadas receberam 1 ml de solução de lise diluídas 1:10 em água destilada, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o período de lise, foi feita a centrifugação a 1500 rpm, a 4°C por 5 minutos e acrescentados aos tubos 1 ml de solução salina e após lavagem foram acrescentados 100 µl de solução paraformaldeído a 4% gelada e incubado por 15 minutos a 4°C. O paraformaldeído bloqueia a síntese de substâncias e é utilizado como fixador. Depois da incubação, as células foram lavadas com solução salina gelada e após descarte, ressuspensas com 200 µl de salina gelada e estocada a 4°C por 24 horas.

Após 24 horas, os tubos foram centrifugados e as células foram ressuspensas em 100 µl de solução Perm/Wash (BD) por 15 minutos, essa solução é um detergente saponina que permite a retenção de citocinas intracelulares, capaz de permeabilizar células, com função de diluente e tampão. Após a lavagem das células e descarte do sobrenadante, foram adicionados nas amostras com estímulo, sem estímulo e controle positivo, 4µl de anti-IFN- γ Alexia (BD/Ambriex) e 11µl de solução Perm/Wash. O controle isotipo recebeu 4 µl de isotipo IgG1 κ Alexia (BD/Ambriex). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C, no escuro. Após o período, foram lavadas e após o descarte do sobrenadante acrescentados 200 µl de salina gelada para análise por citometria de fluxo.

4.9.4.3 Aquisição e análise dos dados das amostras

Utilizamos o *Software* Cellquest 3.1 e as determinações de frequência foram usadas para calcular o número ou frequência das células. A porcentagem das células que reagem positivamente ao anticorpo marcado com fluorocromo é a determinação da frequência. Os dados do histograma foram apresentados sob forma de coluna simples, onde o eixo x indica a intensidade da fluorescência e o eixo y o número de células. Os

controles positivos e negativos são utilizados para determinar a ligação específica do reagente marcado e são úteis na determinação da especificidade (SHAPIRO, 1998).

Foram definidos os parâmetros de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) e realizada a seleção do linfócito (gate) denominado R1 (figura 5A).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as perdas por curso e as características sócio-demográficas utilizamos o teste qui-quadrado através do Programa R versão 2.6.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Na análise estatística da produção de citocinas e a expansão de $CD8^+IFN-\gamma^+$ entre dois tempos nos revacinados e controles, nós utilizamos o teste Mann-Whitney para análises não paramétricas e para as avaliações entre dois tempos no mesmo grupo utilizamos o teste Wilcoxon pareado. O teste Kruskal-Wallis para análises não paramétricas avaliou os três tempos do grupo revacinado e controle. A correlação entre os níveis de $IFN-\gamma$ e IL-10 e de $IFN-\gamma$ e TNF, bem como a correlação entre $IFN-\gamma$ T2/T0 e tamanho da cicatriz foram feitos a partir da correlação de Spearman. As análises e os gráficos foram obtidos a partir do Software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

Para avaliarmos a expansão de células $CD8^+IFN-\gamma^+$ nos tempos de avaliação dividimos a proporção de células $CD8^+IFN-\gamma^+$ no gate de linfócitos (R1) pelo número total de células $CD8^+$, no mesmo gate (R1) (figura 5A). O índice de expansão de células $CD8^+IFN-\gamma^+$ com antígeno foi calculado dividindo a proporção de células $CD8^+IFN-\gamma^+$ divididas pela percentagem de linfócitos $CD8^+$ totais encontradas nas culturas estimuladas com antígeno pela proporção encontrada em culturas não estimuladas. Esse cálculo foi feito nos três tempos. Logo após, dividimos a razão do tempo dois meses pela razão do tempo zero e obtivemos o valor do $T2\div T0$. O mesmo foi feito com $T12\div T0$.

1. Cálculo da razão entre culturas estimuladas e não estimuladas (T0, T2 e T12, separadamente).

$$\text{Razão Mtb} = \frac{\% \text{CD8}^+ \text{IFN-}\gamma^+ \div \% \text{CD8}^+ \text{ Mtb}}{\% \text{CD8}^+ \text{IFN-}\gamma^+ \div \% \text{CD8}^+ \text{ Meio}}$$

2. Depois, fizemos a divisão dos resultados da razão do tempo 2 com tempo zero e do tempo doze meses com tempo zero

$$\text{Razão T2} = \frac{\text{Razão tempo dois meses}}{\text{Razão do tempo zero}}$$

$$\text{Razão T12} = \frac{\text{Razão tempo doze meses}}{\text{Razão do tempo zero}}$$

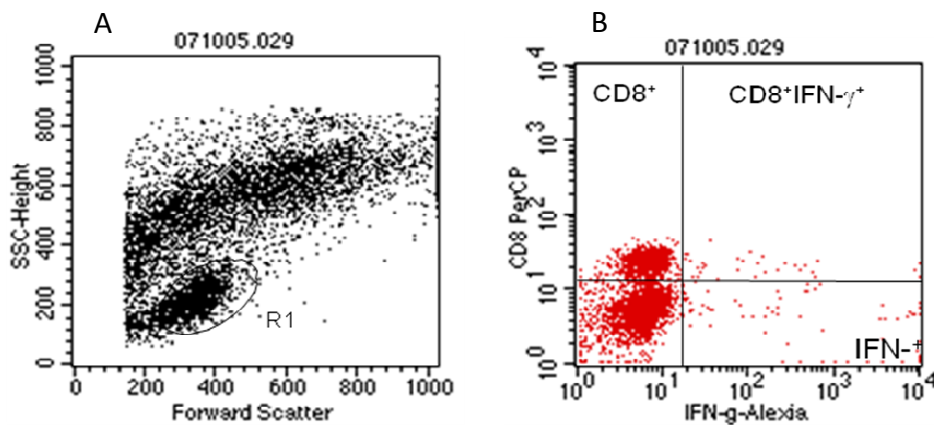


Figura 5. Análise por citometria de fluxo de células TCD8⁺ produtoras de IFN-γ. (A) Detectores FSC e SSC não sensíveis a fluorescência usados para discriminar células marcadas e não marcadas das partículas estranhas. Gate (R1) é a população celular selecionada. (B) Marcação da superfície celular de células TCD8⁺IFN-γ⁺.

5.RESULTADOS

5.1 Características da população do estudo

Foram recrutados 927 universitários da área de saúde da FBDC em Salvador (Bahia, Brasil).

Um total de 806 voluntários completaram o teste tuberculínico, com aplicação do teste e retorno para leitura (realizado em única aplicação para os indivíduos com resultado de endureção acima de 4 mm, e em dupla aplicação, com intervalo de 7 a 10 dias, para os indivíduos com resultado abaixo de 4mm, para confirmação da negatividade ao teste).

Os voluntários tinham em média 19 anos (17-43 anos), sendo a maioria (72,6%) entre 17 e 20 anos de idade. Partiparam 65,7% mulheres e 34,3% de homens. A renda média familiar dos participantes foi de 4 salários mínimos. Destes voluntários, 9,4% afirmaram ter tido contato com pacientes com tuberculose e uma pessoa relatou já ter tido a doença (Tabela 1).

Para avaliar as perdas do estudo, consideramos voluntários que fizeram aplicação do teste e não retornaram para primeira leitura, e voluntários com resultado inferior a 5mm (TST negativo) que não retornaram para segunda aplicação do PPD ou que fizeram o TST, mas não compareceram para segunda leitura. 87% (806) dos voluntários completaram o teste tuberculínico na primeira aplicação e leitura e 13% (121) não retornaram em alguma dessas etapas. Entre os voluntários, 32% (297) tiveram o TST acima de 4mm, e 55% (509) negativos ao TST foram orientados a retornarem após uma semana para repetição. Destes, 54% (275) completaram o teste tuberculínico e houve perda de 46% (234) de estudantes. Na segunda aplicação do PPD, 12% (62) tiveram conversão do teste, chamado efeito *booster*, e conseqüentemente foram considerados não negativos ao TST. A tabela 2 mostra que os cursos que apresentaram proporção significativamente menor de perdas foram os cursos de medicina e enfermagem, ambos da UFBA, com 19,7% e 13,5%, respectivamente ($p < 0.05$).

Tabela 1 –Características sócio-demográficas da população do estudo e exposição ao *M. tuberculosis*.

População do estudo	N	(%)
Idade (anos)		
17- 20	673	72,6
21-25	229	24,7
26-30	18	2
> 30	7	0,7
Gênero		
Masculino	318	34,3
Feminino	609	65,7
Renda Familiar (em SM¹)		
1	4	0,4
1 a 2	29	3,1
2 a 5	150	16,2
5 a 10	226	24,4
10 a 20	305	33
> 20	183	19,7
Não responderam	30	3,2
Contato com BK²		
Sim	87	9,4
Não	822	88,7
Não responderam	18	1,9
Já teve tuberculose		
Sim	1	0,1
Não	915	98,7
Não responderam	11	1,2

¹SM - salários mínimos ²BK - Bacilo de Koch

Dentre os voluntários avaliados, 64% dos voluntários do sexo feminino e 36% do sexo masculino não completaram o teste tuberculínico, mas não houveram diferenças significativas na percentagem de perdas entre esses grupos ($p > 0,05$, teste qui-quadrado; tabela 2).

Tabela 2 – Total de perdas¹ de voluntários que não retornaram para leitura do primeiro teste tuberculínico ou que não retornaram para aplicação e leitura do segundo TST durante o estudo, descrito entre os cursos e entre sexo.

	Perdas (%)	Significância (qui-quadrado) ²
Cursos		
Medicina-FBDC ²	108(30,4)	
Fisioterapia -FBDC	32(9,0)	p=0.84
Medicina – UFBa	70(19,7)	<i>p<0.01</i>
Enfermagem- UFBa	48(13,5)	<i>p=0.01</i>
Farmácia - FBDC	39(11,0)	p=0.72
Nutrição - FBDC	30(8,5)	p=0.18
Fonoaudiologia - FBDC	18(5,0)	p=0.31
Odontologia - FBDC	10(2,9)	p=0.10 ³
Sexo		
Masculino	128(36)	p=0.18
Feminino ²	227(64)	

¹ O TST foi considerado completo quando houve aplicação e leitura do diâmetro da endureção no indivíduo, e o mesmo apresentou endureção > 4 mm, ou, para os casos em que o diâmetro da endureção foi igual ou <4 mm, sempre que o indivíduo tenha comparecido a uma segunda aplicação e leitura do diâmetro da reação. Nos demais casos, o TST aplicado foi considerado incompleto, e o voluntário foi considerado como perda.

² O valor de p compara as proporções de perdas e não perdas no teste tuberculínico (TST) entre o curso selecionado e o curso com maior % de perdas (Medicina- FBDC), ou as proporções de perdas e não perdas entre os voluntários do sexo masculino e os voluntários do sexo feminino.

³ No curso de odontologia foi utilizado o teste exato de Fisher devido pequeno número de voluntários

FBDC - Fundacao Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências

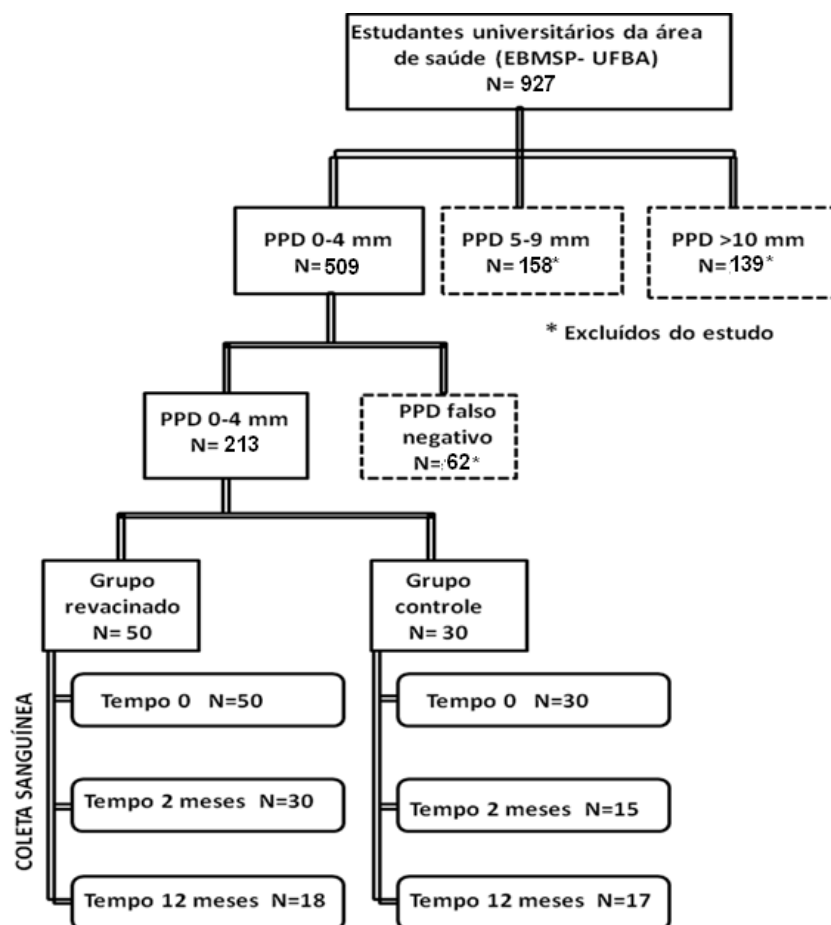
UFBa - Universidade Federal da Bahia;

5.2 Revacinação com BCG

Do total de 927 voluntários selecionados, 55% (509) completaram o teste com a aplicação e leitura e foram PPD negativo, 32% (297) completaram o teste e foram PPD positivo e houve perda de 13% (121) de voluntários. Dos 509 voluntários PPD negativo no primeiro teste, 54% (275) retornaram para aplicação do segundo PPD e destes, 42% (213) tiveram TST negativo em dupla testagem enquanto que 12% (62) foram PPD falso-negativo. Na segunda aplicação do teste tuberculínico houve perda de 46% (234) dos voluntários que não retornaram para aplicação ou leitura do teste. Os voluntários

PPD duplo-negativo foram contactados para questionar seu interesse em participar do estudo e randomizados para pertencer ao grupo revacinado ou controle. Após informação da próxima etapa do estudo, com coleta sanguínea, acompanhamento e revacinação, 87 (41%) voluntários aceitaram participar do estudo e 126 (59%) não aceitaram a sua participação ou não compareceram à primeira coleta (Quadro 1).

Quadro 1 – Seleção e perdas de voluntários durante a fase de aplicação e leitura do TST e coleta sanguínea, nos tempos 0, após 2 meses e após 1 ano da primeira coleta.



Dos 87 voluntários negativos ao teste tuberculínico em dupla testagem, que consentiram em participar do estudo, 7 foram excluídos por não terem respondido o questionário.

Dos 80 voluntários que aceitaram participar do estudo, preencheram os questionários e compareceram à primeira coleta, 50 tinham sido randomizados a fazer parte do grupo revacinado e 30 do grupo controle (não revacinado). Dos 50 voluntários do grupo revacinado, 30 compareceram após 2 meses da revacinação para a coleta sanguínea, e apenas 18 destes compareceram novamente após 1 ano. Dos 30 voluntários do grupo controle, 15 retornaram após dois meses e 17 após um ano (Quadro 1).

Dez voluntários do grupo controle e 13 do grupo revacinado participaram apenas da primeira coleta e não retornaram para as outras etapas do estudo. O número daqueles que compareceram nas três coletas sanguíneas (tempo 0, após 2 meses e após um ano) foi similar entre revacinados e controles (13 voluntários), porém quando observado aqueles que vieram no tempo inicial e retornaram apenas dois meses depois, houve maior número dos voluntários que receberam a vacina (18 estudantes) quando comparado aos controles (4 estudantes).

Alguns só compareceram na 1ª coleta e na última após 1 ano (5 revacinados e 3 controles). Os voluntários que retornaram após um ano repetiram o TST. Todos os voluntários revacinados apresentaram teste positivo acima de 08mm, enquanto que dois controles apresentaram conversão do teste, com positividade ao TST após um ano.

A tabela 3 compara os grupos revacinado e controle quanto às suas características sócio-demográficas e a exposição ao bacilo. Dos estudantes que se voluntariaram para o estudo, 70% foram mulheres, sendo a maioria em ambos grupos. A média de idade foi de 20 anos (17-43 anos; desvio padrão de 5,1) nos voluntários controles e 19 anos (17-26 anos; desvio padrão de 1,8) nos voluntários revacinados. O grupo é homogêneo, não apresentando diferença estatística significativa quanto ao relato de contato prévio com pacientes com tuberculose, renda familiar, sexo ou idade ($p > 0.05$; teste qui-quadrado).

Tabela 3- Características sócio-demográficas e exposição ao *M. tuberculosis* entre os voluntários dos grupos revacinado e controle.

	Revacinado	Controle	Significância ¹
Gênero	N (%)	N (%)	
Masculino	13 (26)	11 (37)	p=0.18
Feminino	37 (74)	19 (63)	p=0.55
Idade (anos)²	20 [17-26]	19 [17-43]	p=0.28
Contato BK³	2 2	0 0	p=0.29
Renda familiar	4 [1-20]	4 [1-20]	p=0.80

¹Teste do qui-quadrado. ²Mediana [mínimo-máximo]. ³BK- Bacilo de Koch; ⁴SM- Salário mínimo.

5.3 Acompanhamento da lesão vacinal

O acompanhamento da lesão vacinal e cicatrização foi realizado nos voluntários do grupo revacinado com BCG. Dos 50 voluntários revacinados, 18 compareceram na primeira semana, um mês e dois meses após aplicação da vacina. Treze voluntários não estiveram na primeira semana, mas compareceram após um e dois meses e 8 estiveram apenas na primeira semana. Um total de 11 voluntários não fizeram acompanhamento. Da 1^a a 2^a semana foi possível verificar mácula avermelhada com endureção da área (Figura 6A); entre a 3^a e a 4^a semana, ocorreu a pústula (que se forma com o amolecimento do centro da lesão, seguida pelo aparecimento da crosta). Na 12^a semana já é observada a cicatriz, com diâmetro entre 4 e 8 mm (Figura 6D).

A tabela 4 lista as características da lesão vacinal e resultados da anamnese e exame clínico entre os voluntários do estudo que compareceram à consulta de acompanhamento. Dos 50 voluntários do grupo revacinado, 26 (52%) retornaram na primeira semana após a revacinação BCG e relataram aparecimento de dor, máculas e pápulas, sendo que a maioria apresentou pústula (73%). Todos estes são sintomas normais da vacinação com BCG.

Na avaliação após 1 mês, foi observado o aparecimento da crosta em 22% e úlcera em 12% dos 31 voluntários que retornaram para avaliação clínica, além da

pústula e sensação de dor local. Dois voluntários tiveram linfonodos axilares aumentados, dois apresentaram febre e 4 tiveram hiperemia. Na última avaliação após 2 meses, a cicatriz já estava formada em 84% dos voluntários (Figura 6 C e D).

Um voluntário relatou ter manipulado a lesão; nesse voluntário houve a ocorrência posterior de drenagem do pus por orifícios ao lado de onde foi aplicada a vacina. Após dois meses, formou-se duas cicatrizes, uma a partir da aplicação da vacina e a outra pela manipulação da lesão (Figura 6B). Este voluntário não utilizou medicação tópica e fez uso de anti-inflamatório a base de diclofenaco potássio.

Tabela 4 – Características da lesão vacinal dos voluntários que compareceram na primeira semana após a revacinação e o acompanhamento após um e dois meses.

Avaliação 1ª semana					
Mácula ¹	Pápula ²	Dor	Pústula ³	Retornaram	Não retornaram
4 (15%)	10 (38%)	10(38%)	19(73%)	26(52%)	24(48)
Após 1 mês					
Crosta ⁴	Pústula	Dor	Úlcera ⁵	Retornaram	Não retornaram
7(22%)	25(80%)	7(22%)	4(12%)	31(62%)	19(38%)
Cicatriz após 2 meses (cm)					
entre 0,4 - 0,7	> 0,7	Crosta 0,4-0,7	> 0,7	Retornaram	Não retornaram
23(74%)	5(16%)	16(51%)	3(9%)	31(62%)	19(38%)

¹ região avermelhada ao redor da lesão.

² elevação eruptiva que se forma na pele, sem pus.

³ vesícula cutânea cheia de pus.

⁴ casca endurecida na superfície da pele.

⁵ lesão de cicatrização lenta.

Vinte e três voluntários (74%) apresentaram cicatriz entre 0,4 a 0,7 cm de diâmetro, 5 (16%) tiveram 0,8cm do tamanho da cicatriz e 16 (51%) ainda apresentavam crosta após dois meses. O voluntário que manipulou a lesão apresentou cicatriz secundária com 0,8 cm de diâmetro.

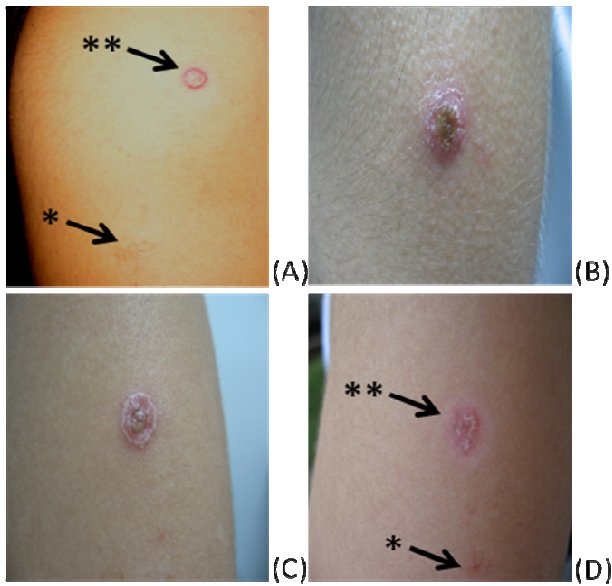


Figura 6. Fotografias da lesão vacinal dos voluntários revacinados com BCG. (A) Cicatriz da primeira vacinação* e lesão vacinal da revacinação**, apresentando pequena úlcera rasa, com crosta fina e melicérica de borda eritrematosa, com 0,5cm de diâmetro. Fotografia tirada após 1 mês da revacinação. (B) Lesão inflamatória após manipulação da pápula. (C) Voluntário com cicatrização normal 1 mês após aplicada a vacina, com formação de crosta e drenagem da pústula. (D) Mesmo voluntário da figura C, porém após 2 meses, onde se verifica cicatrização da revacinação ** e cicatriz da primo-vacinação*.

5.4 Análises hematológicas e sorológicas

As análises hematológicas foram realizadas após cada coleta sanguínea, nos três tempos de avaliação dos voluntários. Para análise destes dados, a média dos três tempos de cada exame foi obtida. A tabela 5 mostra que os valores do leucócitos estiveram de acordo com os valores de referência, nos voluntários de ambos sexos. Três voluntários e 5 voluntárias apresentaram valor do hematócrito inferior ao valor de referência e apenas duas mulheres tiveram valor acima do esperado.

Tabela 5- Valores do hemograma obtidos a partir da média dos exames da coleta sanguínea realizada no tempo 0, após 2 meses e 1 ano da revacinação.

Hemograma	Masculino	Feminino
Hematócrito(%)	44,9 [33,7- 52,5]	39,3 [13,5-56,3]
VR	40-54	36-48
Leucócitos (milhões/ml)	7,2 [3-16]	7,8 [3-14]
VR	3,8-11	3,8-11
Eritrócitos (milhões/ml)	5,2 [3,7- 6,1]	4,5 [3,0- 6,4]
VR	4,5-6,1	4,0-5,4
Linfócitos (%)	31 [15-57]	33 [10-77]
VR	18-48	18-48
Neutrófilos (%)	60 [29-77]	57 [14 – 84]
VR	40-70	40-70
Monócitos (%)	5,4 [0,8-10,2]	5,7 [0,9-28,8]
VR	3,0-10	3,0-10

VR - Valor de referência

Os mesmos voluntários com hematócrito baixo apresentaram também valores inferiores de contagem de eritrócitos. O valor de referência máximo na percentagem de linfócitos é 48% nas mulheres, porém duas voluntários tiveram valores superiores com 72 e 77% . Essas voluntárias tiveram valores abaixo da média no hematócrito e na contagem de eritrócitos e os demais exames foram normais. Um estudante do sexo masculino e uma do sexo feminino apresentaram percentagem de neutrófilos bastante elevada (77% e 84%, respectivamente). Anomalias ocorreram também em poucos voluntários quanto aos valores de monócitos, no qual 1 voluntário teve percentagem bastante reduzida de monócitos (0,8%, sendo valor de referência mínimo 3% de monócitos) e uma voluntária com valor acima de 28%, sendo valor de referência máximo 10%. Pela análise sorológica, nenhum voluntários foi excluído por ser portador do HIV.

5.5 Produção de citocinas *in vitro*

5.5.1 Tempo zero

A mediana de produção de IFN- γ foi maior nas culturas estimuladas do que nas culturas sem estímulo, e apesar de alguns voluntários do grupo revacinado já apresentarem altos níveis de produção de IFN- γ no tempo zero, não houve diferença estatística significativa entre os grupos revacinado e controle comparando as culturas sem estímulo ($p=0.06$, teste Mann-Whitney) ou estimuladas com Mtb ($p=0.47$, teste Mann-Whitney; tabela 6).

Quando comparamos a produção de citocinas entre culturas de sangue total estimuladas com Mtb e culturas sem estímulo, tanto para o grupo revacinado como para o grupo controle, observamos aumento significativo da produção de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e TNF ($p<0.01$, teste Mann-Whitney). Porém, não observamos diferenças na produção de IL-10 quando comparamos as culturas estimuladas e não estimuladas, tanto nos revacinados quanto nos controles ($p=0.08$, teste Mann-Whitney). A tabela 6 mostra que houve diferença significativa nos níveis das citocinas TNF, IL-10, IL-2 e IL-4 em culturas não estimuladas entre revacinados e controles, apesar disso os valores foram sempre muito baixos, próximos ao limite de detecção do teste (tabela 6). Já nas culturas estimuladas com antígeno, não observamos diferenças estatísticas em nenhuma citocina quando comparamos os grupos revacinados e controles ($p>0.05$, teste Mann-Whitney; tabela 6).

Tabela 6- Produção de citocinas no sobrenadante de culturas de sangue total cultivadas com estímulo de antígeno total lisado do *M.tuberculosis* e sem estímulo, no tempo zero.

	Revacinado	Controle	Limite de detecção¹	Significância²
IFN-g (pg/ml)				
Sem estímulo	6 [0-187]	70 [0-95]	7.1	p=0.06
MtbAg	2020[0-45179]	1590[0-29099]		p=0.47
TNF (pg/ml)				
Sem estímulo	0 [0-17]	7 [0-9]	2.8	p=0.01
MtbAg	44 [0-392]	39 [0-229]		p>0.17
IL-10 (pg/ml)				
Sem estímulo	1 [0-4]	0 [0-3]	2.8	p<0.01
MtbAg	0 [0-115]	0 [0-156]		p=0.50
IL-6 (pg/ml)				
Sem estímulo	0 [0-2525]	0 [0-843]	3.0	p=0.22
MtbAg	5351 [11-27222]	5639 [0-11058]		p=0.69
IL-2 (pg/ml)				
Sem estímulo	2 [1-8]	5 [0-6]	2.6	p=0.03
MtbAg	25 [0-33]	23 [0-35]		p=0.46
IL-4 (pg/ml)				
Sem estímulo	11 [6-20]	17 [3-21]	2.6	p=0.01
MtbAg	79 [0-116]	75 [0-116]		p=0.53

MtbAg – antígeno total lisado do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

¹ Limite de detecção do teste em pg/ml. ²O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos (p≤0.05).

5.5.2 Tempo de dois meses

Novamente, após a revacinação, os níveis de citocinas encontravam-se mais elevados nas culturas com estímulo do que nas culturas sem estímulo (TNF, p=0.01; IL-6 e IL10, p<0.0001; e IL-2, IL-4 e IFN-γ p<0.001, teste de Mann-Whitney). Ao

comparar os voluntários revacinados e controles, apenas a produção de IFN- γ apresentou diferença significativa nas culturas de sangue total estimuladas com antígeno de *M. tuberculosis*, significativamente maior no grupo revacinado do que no grupo controle (figura 7).

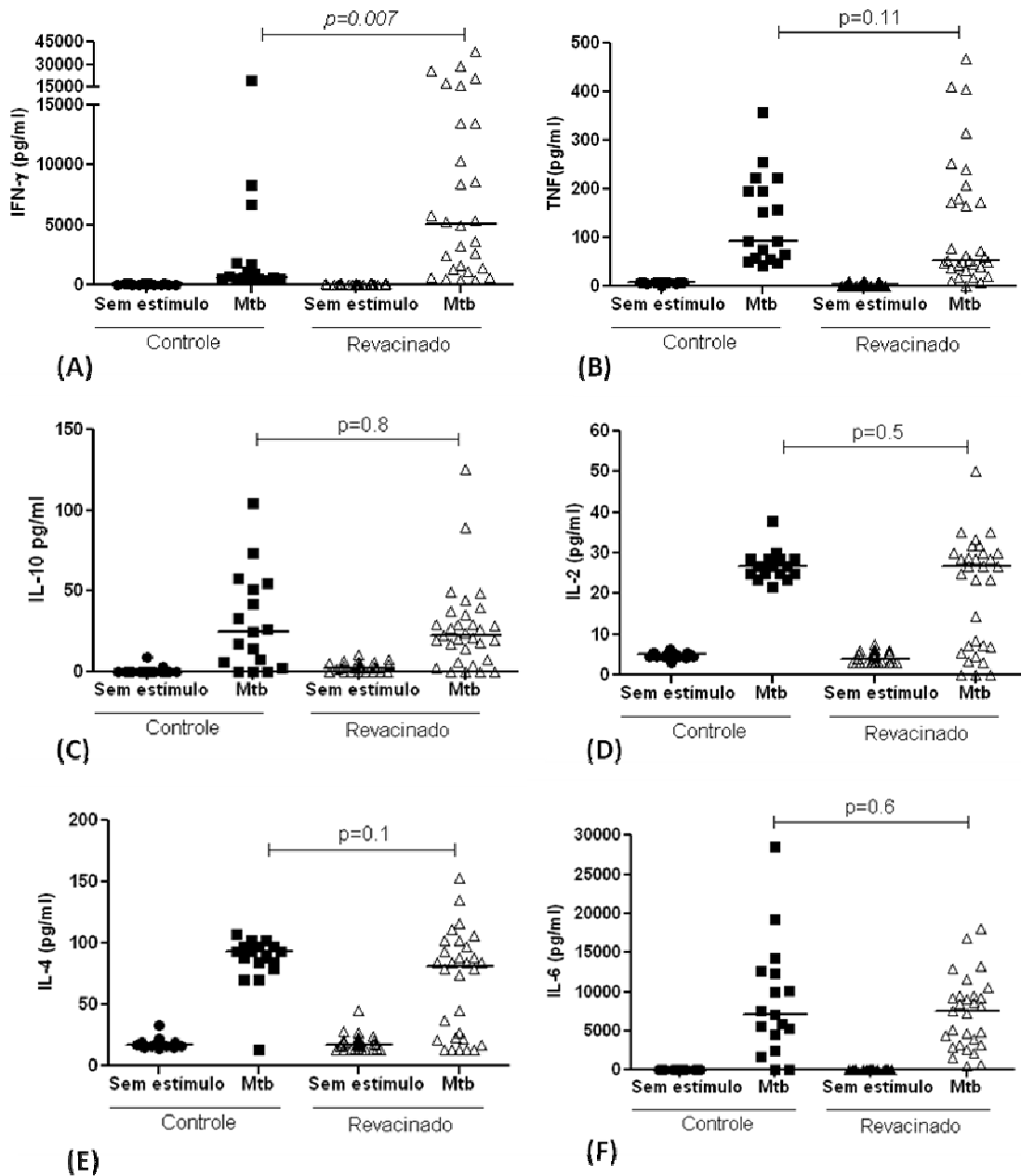


Figura 7. Produção de citocinas em culturas de sangue total de voluntários revacinados ou controles com ou sem estímulo por antígeno micobacteriano (Mtb), dois meses após a primeira coleta. As barras horizontais mostram a mediana. (A) Níveis de IFN- γ (B) Níveis de TNF; (C) Níveis de IL-10; (D) Níveis de IL-2; (E) Níveis de IL-4; (F) Níveis de IL-6.

Na Figura 8, comparamos a produção de IFN- γ nas culturas de sangue total estimuladas com antígeno, para cada voluntário, nos tempos zero e dois meses após a revacinação.

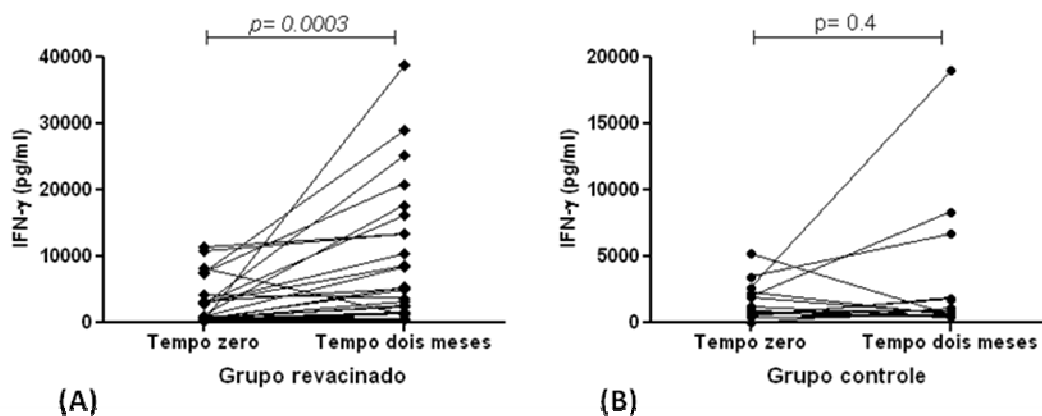


Figura 8. Produção de citocinas em culturas de sangue total de voluntários revacinados e controles, nos tempos zero e dois meses após a primeira coleta. (A) grupo revacinado; (B) grupo controle. Teste Wilcoxon pareado.

Houve aumento significativo dos níveis de IFN- γ nos voluntários revacinados quando comparamos os níveis no tempo zero com aqueles obtidos 2 meses pós-BCG (figura 8A). O mesmo não ocorreu quando avaliamos os voluntários controles, que não apresentaram diferença significativa entre o tempo zero e o tempo de dois meses (figura 8B). Quanto às outras citocinas avaliadas, apenas a produção de IL-10 apresentou diferença significativa quando comparadas as culturas estimuladas com o antígeno no tempo zero e dois meses após a primeira coleta, tanto nos revacinados quanto nos controles, porém estes valores estavam no limite de sensibilidade do teste. A mediana de IL-10 encontrada no tempo dois meses no grupo revacinado foi de 22 pg/ml, enquanto que grupo controle foi de 24 pg/ml ($p=0.005$ na comparação entre o tempo zero e o tempo de dois meses, para o grupo revacinado, e $p=0.01$ para o grupo controle, teste Wilcoxon pareado).

Não houve correlação entre IL-10 e IFN- γ em ambos grupos ($p=0.3$, Spearman $r = -0.1$, grupo revacinado; $p=0.8$, Spearman $r = -0.06$, grupo controle), como também não foi observada correlação entre a produção de IFN- γ e IL-6 ($p=0.2$, Spearman $r =$

0.2, nos revacinados e $p=0.2$, Spearman $r=0.3$, nos controle). Porém, foi observada correlação significativa, positiva na análise entre TNF e IL-6 nos revacinados, mostrando que quanto maior produção de TNF maior a de IL-6 (figura 12A). O mesmo não ocorreu nos controles (Figura 9B).

Quando avaliamos IFN- γ e TNF, também houve correlação significativa, positiva nos revacinados, mas não houve correlação nos controles (figura 9C e 9D).

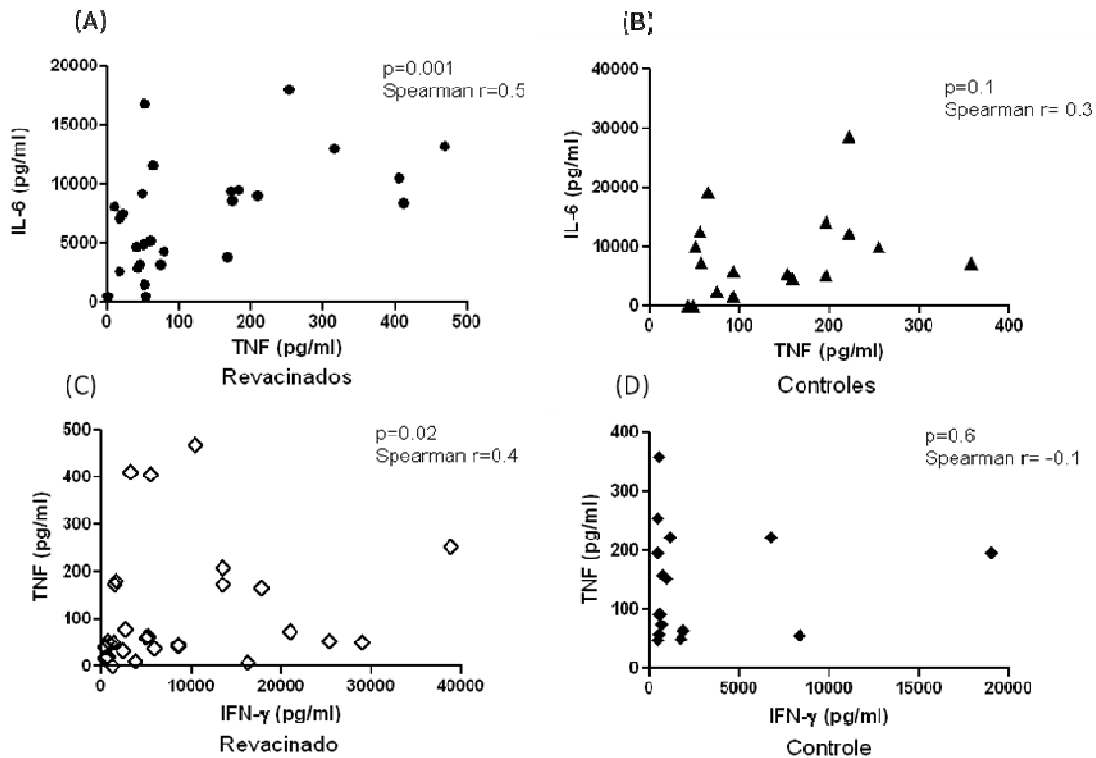


Figura 9. Correlações entre níveis de citocinas em culturas de sangue total de voluntários revacinados e controles, no tempo de dois meses. Correlação entre a produção de TNF e a de IL-6 nos revacinados (A), e nos controle (B). Correlação entre TNF e IFN- γ nos revacinados (C), e nos controles (D).

Nós calculamos a magnitude do aumento da produção de IFN- γ em resposta a estimulação com antígenos micobacterianos, como sendo a razão entre os valores obtidos nas culturas pré (T0, tempo zero) e pós BCG (T2, tempo de dois meses), para cada indivíduo. A mediana dos valores de razão T2/T0 foi de 2,784. Assim, dividimos o grupo revacinado em 2 subgrupos, considerando como voluntários com alta

responsividade aqueles indivíduos cuja razão T2/T0 de produção de IFN- γ igualou ou superou a mediana (ou seja, foi igual ou superior a 2,784), e voluntários com baixa responsividade aqueles indivíduos revacinados cuja razão T2/T0 de produção de IFN- γ foi inferior a 2,784.

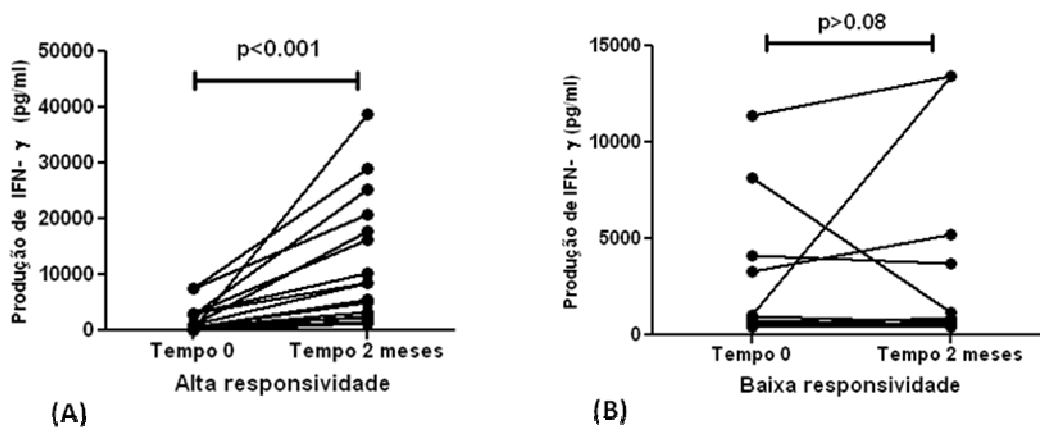


Figura 10 . Produção de IFN- γ em culturas de sangue total estimuladas com MtbAg, nos tempos zero e dois meses após a primeira coleta, nos subgrupos com alta responsividade à revacinação (A), e baixa responsividade (B).

Quando comparamos a produção de IFN- γ em culturas de sangue total estimuladas com antígeno nos tempo zero e 2 meses pós-BCG, entre os voluntários com alta responsividade observamos aumento estatístico significativo (figura 10A). Porém, no subgrupo com baixa responsividade, não houve diferença significativa entre estes tempos de avaliação (figura 10B).

Além disso, como mostrado na figura 11B, houve uma produção de IFN- γ estatisticamente maior nas culturas de sangue total do subgrupo com alta responsividade no tempo de dois meses, em comparação com o subgrupo com baixa responsividade. O mesmo não ocorreu na avaliação feita no tempo zero, pré-BCG (figura 11 A).

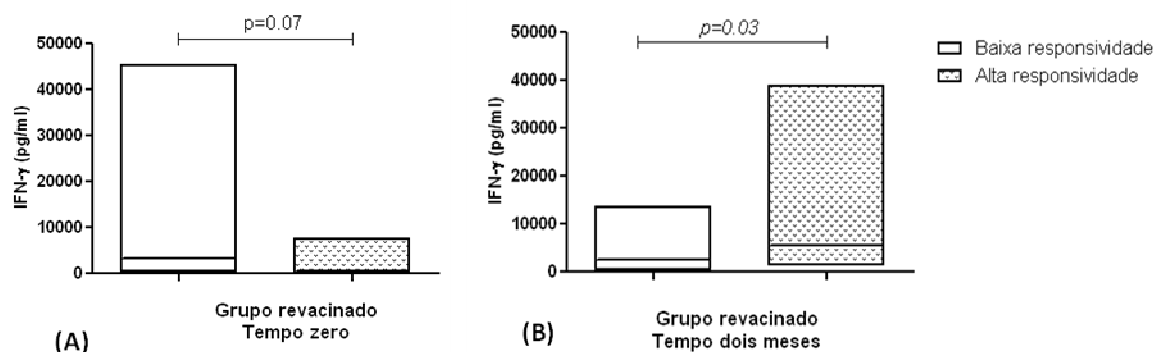


Figura 11. Produção de IFN- γ em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, dois meses após a primeira coleta, nos subgrupos com alta responsividade e com baixa responsividade.

A tabela 7 mostra que não houve diferença significativa na produção de TNF, IL-10, IL-2, IL-4 ou IL-6 entre os voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade, quando comparados 2 meses após a revacinação.

Tabela 7 – Avaliação de citocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, 2 meses pós-BCG, para os voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade.

Citocinas (pg/ml)	Baixo respondedores	Altos respondedores	Significância ¹
TNF	43 [0-314]	73 [7-468]	p=0.1
IL-10	20 [0-49]	24 [0-125]	p=0.6
IL-2	15 [0-31]	28 [0-50]	p=0.1
IL-4	59 [12-102]	83 [12-153]	p=0.1
IL-6	7819 [506-12995]	5184 [1517-18019]	P=0.5

¹Teste Mann-Whitney

Apenas nos voluntários com baixa responsividade foi possível verificar uma correlação significativa, positiva, entre os níveis de produção de IFN- γ e de TNF nas culturas de sangue total, na avaliação 2 meses pós-BCG (figura 12A). Também foi verificada correlação significativa, negativa, entre os níveis de IFN- γ e IL-10 nas

culturas de sangue total de voluntários com alta responsividade no tempo de dois meses pós-BCG (figura 12B) .

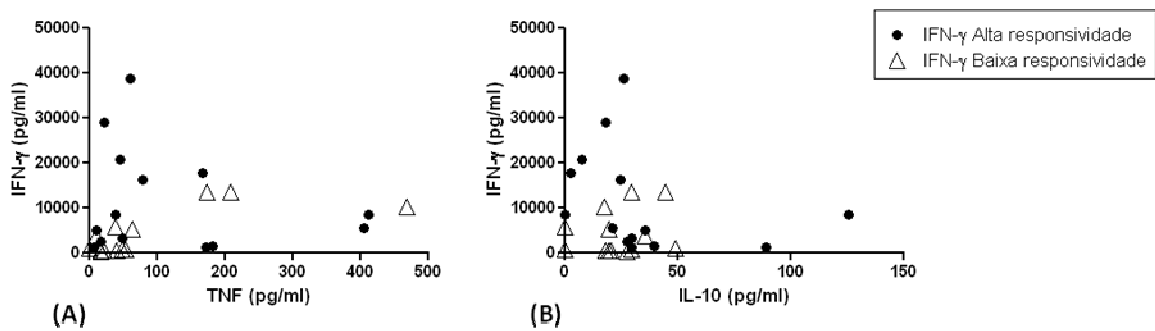


Figura 12. Correlações entre níveis de citocinas em culturas de sangue total de voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade, no tempo de dois meses. (A) Correlação entre a produção de IFN- γ e a de TNF (nas culturas dos indivíduos com baixa responsividade encontrou-se $p=0.03$, Spearman $r=0.58$, e nas culturas daqueles com alta responsividade encontrou-se $p=0.7$, Spearman $r=0.1$). (B) Correlação entre IFN- γ e IL-10 (nas culturas de alto respondedores encontramos $p=0.03$, Spearman $r= -0.5$, e naquelas de baixo respondedores, $p=0.6$, Spearman $r= 0.12$).

Não houve correlação entre a produção de IL-6 e TNF nos indivíduos com alta responsividade ($p=0.7$, Spearman $r= -0.1$), porém quando avaliamos com baixa responsividade observamos correlação significativa e positiva (Figura 13).

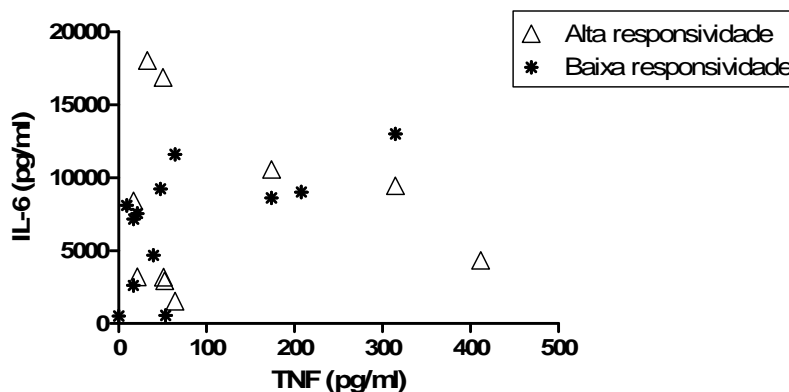


Figura 13. Correlação entre níveis de TNF e IL-6 entre indivíduos com alta responsividade ($p=0.7$, Spearman $r= -0.1$) e com baixa responsividade ($p=0.01$, Spearman $r= 0.6$).

5.5.3 Tempo de 12 meses

Podemos observar na tabela 8 os níveis de citocinas avaliadas após um ano em culturas de sangue total estimuladas com antígenos micobacterianos (MtbAg) ou sem estímulo, para os indivíduos revacinados e controles. Semelhante ao observado para o tempo de dois meses, a produção de IFN- γ foi significativamente superior em culturas de sangue total estimuladas com MtbAg de voluntários revacinados, quando comparados com controles. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e revacinado quando avaliamos a produção de IL-10, IL-2, IL-4, IL-6 e TNF um ano após a revacinação, em culturas estimuladas ou não com o antígeno (tabela 8).

A figura 17 mostra a resposta de IFN- γ em culturas estimuladas com MtbAg nos diferentes tempos avaliados, para os voluntários controles e revacinados. Na comparação entre os tempos zero, dois meses e um ano houve aumento significativo dessa citocina nas culturas de voluntários revacinados ($p=0.0012$, teste de Kruskal-Wallis) mas não entre os controles ($p=0.11$, teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 8- Avaliação da produção de citocinas em culturas de sangue total, estimuladas ou não com antígeno (MtbAg), um ano após a primeira avaliação, para voluntários revacinados e controles.

Avaliação 1 ano	MtbAg-revacinado	MtbAg-controle	Sem estímulo	Significância ¹
IFN- γ	757 [74-48979]	219 [341-9775]	50 [39-348]	$p<0.01$
TNF	0 [0-0.8]	77 [0-1598]	0 [0-2374]	$p=0.14$
IL-10	44 [0-258]	75 [0-434]	2 [2-15]	$p=0.16$
IL-2	0 [0-11]	0 [0-11]	0 [0-3]	$p=0.67$
IL-4	20 [0-85]	30 [0-86]	2 [2-16]	$p=0.31$
IL-6	527 [0-43149]	547 [12-19560]	12 [0-13]	$p=0.71$

¹ O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos.

Nos indivíduos que receberam a vacina, quando comparamos os resultados obtidos 2 meses após a revacinação com os obtidos um ano pós-BCG, não observamos diferença estatística, porém ao compararmos os valores obtidos para o tempo zero com os encontrados um ano pós-BCG observamos aumento significativo (figura 14A). Não houveram diferenças significativas na produção de IFN- γ em culturas de sangue total de

voluntários controles, quando comparamos os tempos zero e um ano, ou quando comparamos os tempos de dois meses e um ano (figura 14B).

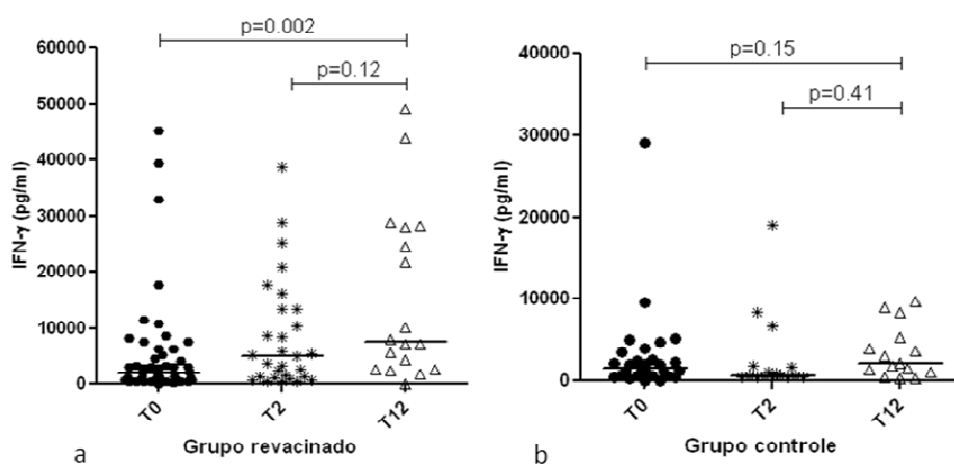


Figura 14. Avaliação da produção de IFN- γ em culturas de sangue total de indivíduos revacinados com BCG e controles, nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e 12 meses (T12) após a primeira avaliação. As barras horizontais representam mediana. a) Grupo revacinado. b) Grupo controle.

Ao compararmos os tempos de dois meses e um ano após a primeira avaliação, não observamos diferenças significativas na produção de TNF ou IL-6, em ambos grupos de voluntários (tabela 9). Tanto os controles quanto revacinados tiveram diminuição significativa na produção de IL-4 e IL-2. Para os controles, houve aumento significativo de IL-10 entre os tempos de dois meses e um ano, o que não foi observado em relação aos revacinados (tabela 9).

Tabela 9- Avaliação da produção de citocinas em culturas de sangue total estimuladas ou não com antígeno, para voluntários revacinados e voluntários controles, nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e um ano (T12) após a primeira avaliação.

Citocinas (pg/ml)	Revacinados ¹			Controles ¹			T2 vs T12 ²	
	T0	T2	T12	T0	T2	T12	Revacinado	Controle
IL-10	0	22	44	0	24	75	p>0.50	p<0.05
IL-2	25	26	0	23	26	0	p<0.01	p<0.01
IL-4	79	81	20	75	92	30	p<0.01	p<0.01
IL-6	535	754	5273	56	7142	5474	p>0.50	p>0.50
TNF	44	53	0	39	92	77	p>0.50	p>0.50

¹Mediana. ² Utilizou-se o teste Wilcoxon pareado para comparar os tempos T2 e T12.

Analizamos também no tempo após um ano os indivíduos com alta responsividade e com baixa responsividade quanto à produção de IFN- γ após estímulo (Figura 15). Os indivíduos com alta responsividade apresentaram aumento significativo da produção de IFN- γ , quando comparados os três tempos ($p < 0.01$, teste de Kruskal-Wallis), sendo significativos os aumentos observados no tempo 2 meses em relação ao tempo zero e no tempo de 12 meses em relação ao tempo zero (Figura 15). Com relação aos indivíduos com baixa responsividade, não houve diferença estatística quando se comparou os três tempos de avaliação ($p > 0.05$, teste de Kruskal-Wallis).

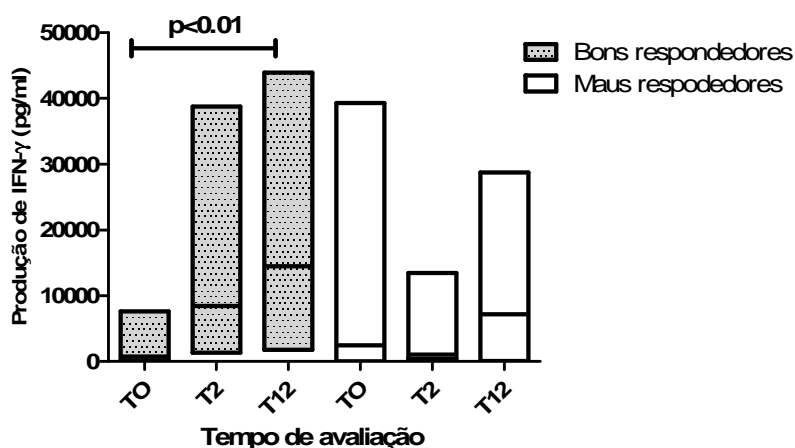


Figura 15. Avaliação dos níveis de IFN- γ nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e doze meses (T12) após revacinação com BCG nos voluntários com alta responsividade (barras cinzas) e com baixa responsividade (barras brancas).

Não foram observadas diferenças quando comparamos a produção de TNF, IL-10, IL-2, IL-4 ou IL-6 em culturas de sangue total de indivíduos com alta e baixa responsividade, no tempo de 12 meses (tabela 10).

Tabela 10. Avaliação da produção de citocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, no tempo de 12 meses pós-BCG, para voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade.

Citocinas	Baixo respondedores	Alto respondedores	Significância ¹
TNF	11 [0-2374]	0 [0-385]	$p=0.71$
IL-10	50 [0-176]	20 [0-258]	$p=0.55$
IL-2	0 [0-11]	0 [0-10]	$p=0.88$
IL-4	30 [0-85]	0 [0-36]	$p=0.36$
IL-6	7023 [0-43149]	5271 [2937-9130]	$p=0.65$

¹ Teste de Mann-Whitney.

Mesmo sem diferença significativa, a produção de IL-10 mostrou-se aumentada após um ano em alguns indivíduos com baixa responsividade (Figura 16).

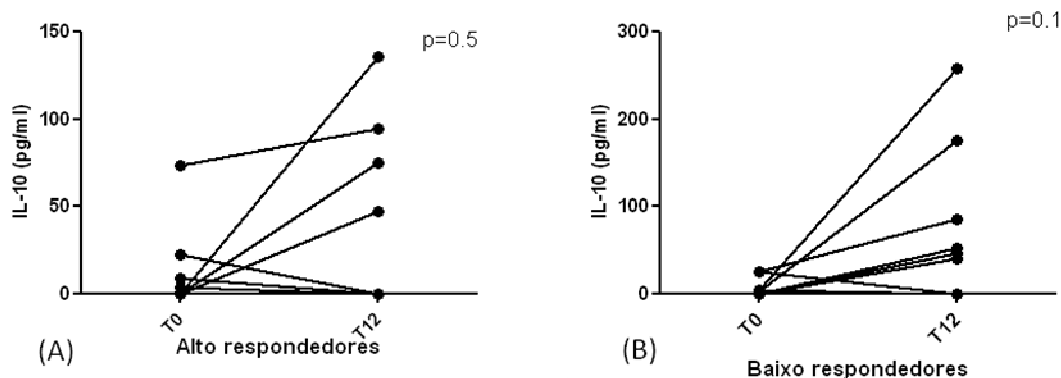


Figura 16. Produção de IL-10 em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, de voluntários com alta responsividade (A) e baixa responsividade (B), nos tempo zero (T0) e doze meses (T12) pós-BCG. A avaliação da significância da diferença entre os tempos foi feita pelo teste pareado de Wilcoxon.

Nas avaliações do tempo de um ano pós-BCG não foram encontradas correlações entre os níveis de IFN- γ e TNF, ou entre os níveis de IFN- γ e IL-10, entre os altos e baixo respondedores (figura 17).

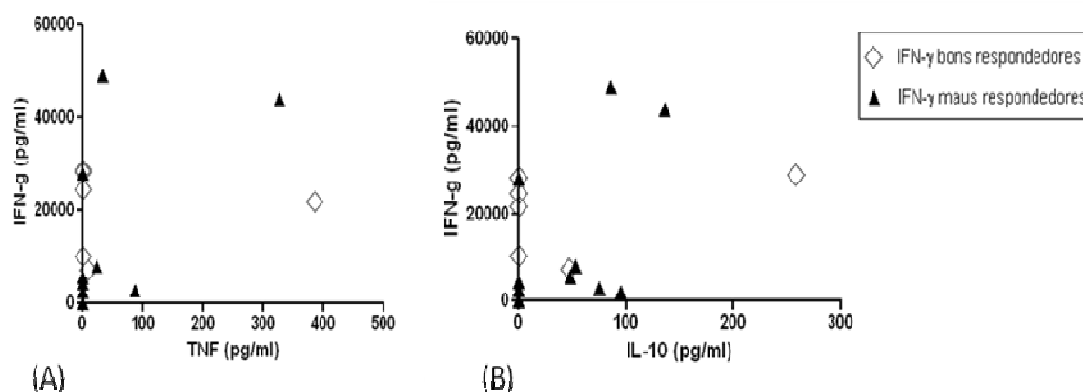


Figura 17. Correlações entre níveis de citocinas em culturas de sangue total de voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade na análise de um ano pós-BCG. (A) Correlação entre os níveis de IFN- γ e TNF (baixo respondedores apresentaram $p=0.1$, Spearman $r=0.49$, e alto respondedores, $p=0.2$, Spearman $r=-0.5$). (B) Correlação entre os níveis de IFN- γ e IL-10 (alto respondedores apresentaram $p=0.7$, Spearman $r=0.16$, e baixo respondedores, $p=0.3$, Spearman $r=0.35$).

5.6 Expansão de células $CD8^+IFN-\gamma^+$

Avaliamos a expansão *in vitro* dos linfócitos $TCD8^+$ produtores de $IFN-\gamma^+$ ao contato com estímulo, nos tempos zero, dois meses e um ano após a primeira coleta, para os voluntários controles e revacinados com BCG.

A proporção de células $TCD8^+IFN-\gamma^+$ nas culturas de sangue total de voluntários revacinados com BCG aumentou quando comparamos os valores obtidos para o tempo zero com os obtidos para o tempo de um ano pós-BCG, mas o mesmo não ocorreu na avaliação entre o tempo zero e dois meses (figura 18A). Nos controles, não observamos diferenças estatísticas entre os valores encontrados para os tempos zero e dois meses nem entre aqueles encontrados para os tempos zero e um ano (figura 18B). O grupo controle não apresentou diferença significativa entre o tempo dois meses e um ano ($p=0.7$, teste de Mann-Whitney) e o mesmo ocorreu com o grupo revacinado ($p=0.2$, teste de Mann-Whitney).

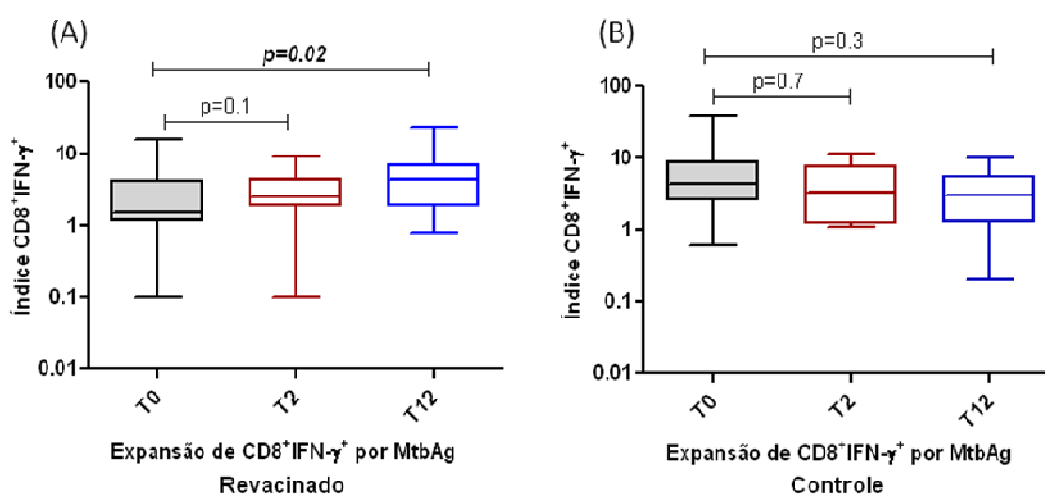


Figura 18. Expansão dos linfócitos T $CD8^+IFN-\gamma^+$ em culturas de sangue total nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e doze meses (T12) após a primeira avaliação. O índice foi calculado tendo em consideração a percentagem de linfócitos T $CD8^+IFN-\gamma^+$ e a percentagem total de linfócitos T $CD8^+$, comparando as culturas estimuladas e não estimuladas com antígeno, conforme descrito em Materiais e Métodos. Para calcular a significância da diferença entre os tempos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Observamos um aumento significativo da proporção de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ em culturas de sangue total de voluntários revacinados, o que não foi observado para os controles (figura 19).

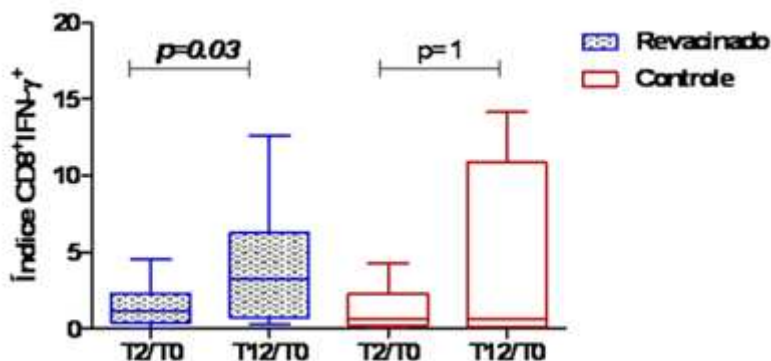


Figura 19. Razão entre a proporção de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ em culturas de sangue total nos tempos dois meses (T2) e doze meses (T12) após a primeira avaliação, e a proporção de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ no tempo zero (T0). Esse “índice CD8⁺IFN- γ ⁺” foi calculado para os voluntários revacinados e controles. Utilizou-se o teste pareado de Wilcoxon para calcular a significância da diferença entre os dois tempos.

A tabela 11 mostra que não houve diferença significativa nas proporções de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ nos tempos zero, dois e doze meses após a primeira avaliação encontradas em culturas de sangue total de voluntários com alta responsividade e com baixa responsividade.

Tabela 11. Expansão *in vitro* dos linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ por estímulo com antígeno em culturas de sangue total de indivíduos com alta responsividade e com baixa responsividade nos tempos zero (T0), dois meses (T2) e um ano (T12) pós-BCG.

CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	Baixo respondores ¹	Alto respondores ¹	Significância ²
T0	1,4 [0,3-11]	2,4 [0,3-20]	p=0,5
T2	0,7 [0,1-4,2]	0,6 [0,1-1,5]	p=0,9
T12	0,7 [0,1-2,8]	1,0 [0,3-3,9]	p=0,3

¹ Mediana [min-máx] ²Teste Mann-Whitney

5.7 Evolução da lesão vacinal e resposta imune

Para avaliar como se correlacionava a evolução da lesão resultante da revacinação com a evolução na capacidade *in vitro* de produção de citocinas, utilizamos os dados do tamanho da lesão um mês após a aplicação da revacinação, bem como do tamanho da cicatriz dois meses pós-BCG, e correlacionamos com a expansão *in vitro* de células CD8⁺IFN- γ ⁺ e a produção de IFN- γ ambas no tempo de dois meses pós-BCG.

Não encontramos correlação entre o tamanho da lesão revacinal e a proporção de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ (p=0.9, Spearman r= -0.02), nem entre o tamanho da lesão revacinal e a produção de IFN- γ (p=0.9, Spearman r= -0.02). A figura 20A mostra a correlação entre o tamanho da cicatriz revacinal e a proporção de células CD8⁺IFN- γ ⁺ em culturas de sangue total, no tempo dois meses. A correlação não foi significativa (p=0.38, Spearman r= 0.3). O mesmo ocorreu em relação à correlação entre o tamanho da cicatriz revacinal e a produção de IFN- γ no tempo de dois meses (p=0.3, Spearman r= -0.2, figura 20B).

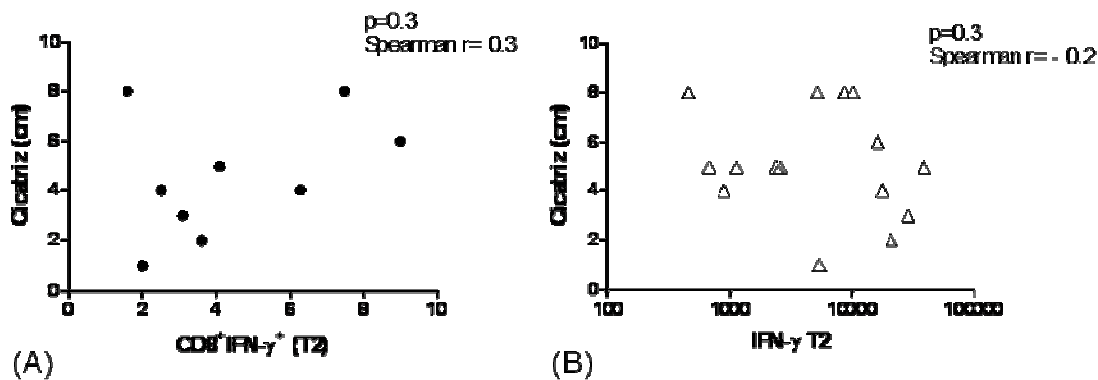


Figura 20. Avaliação da correlação entre o tamanho da cicatriz (em cm) formada dois meses após a revacinação e a proporção de células CD8⁺IFN- γ ⁺ (A) ou a produção de IFN- γ (B), em culturas de sangue total estimuladas com antígeno, no tempo de dois meses pós-BCG.

Também não houve correlação quando avaliamos o tamanho da cicatriz em função da razão T2/T0 da produção de IFN- γ (p=0.3, Spearman r= -0.2). Não foi possível fazer a correlação entre o índice CD8⁺IFN- γ ⁺ e o tamanho da cicatriz, pelos

poucos voluntários que retornaram após um ano da revacinação. A figura 21 mostra correlação significativa, positiva, considerada perfeita entre o tamanho da cicatriz formada após a revacinação e o tamanho da cicatriz da primeira vacinação realizada na infância (figura 21A). Não foi encontrada correlação quando avaliou-se o tamanho da lesão pós-revacinação com cicatriz da primo-vacinação (figura 21 B).

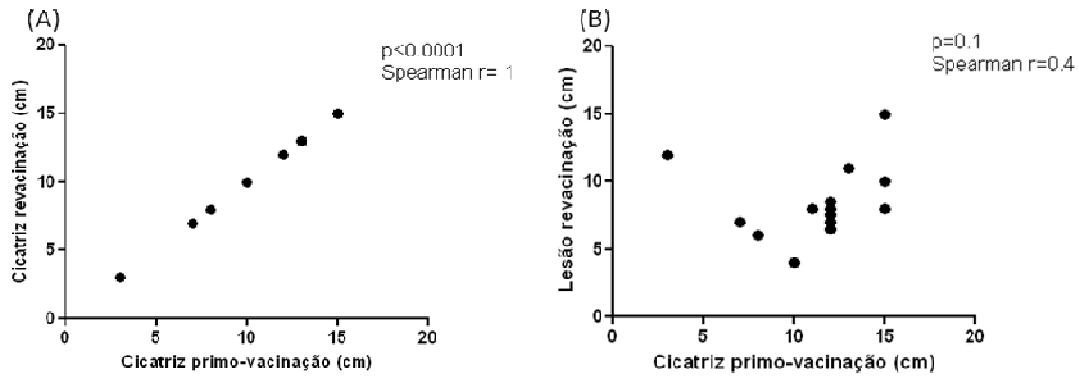


Figura 21. Análise da cicatriz e da lesão pós-vacinação. Correlação entre tamanho da cicatriz pós-revacinação e da primo-vacinação (A). Correlação entre tamanho da lesão após revacinação e cicatriz primo-vacinação (B).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível demonstrar que a revacinação de adultos jovens com a vacina BCG é capaz de modular a resposta *in vitro* a antígenos micobacterianos. Os nossos achados demonstram também que existem diferenças entre os indivíduos revacinados, na sua capacidade de responder ao estímulo *in vitro*, que podem ter importantes conseqüências na avaliação da eficácia da vacina. Nós mostramos que houve aumento da capacidade de produção de citocinas *in vitro*, por estímulo com antígeno total de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MtbAg), destacando-se a produção de IFN- γ . Essa citocina, dois meses após a administração da vacina, apresentou níveis significativamente mais elevados nas culturas, quando estimuladas, de voluntários revacinados, mas não nas dos controles. Observamos também que a capacidade aumentada de produção de IFN- γ por estímulo *in vitro* se manteve um ano após a revacinação, sugerindo persistência da resposta de memória. Aumento significativo da produção *in vitro* de IFN- γ , por estímulo específico, persistindo por pelo menos um ano após a revacinação com BCG, foi descrito por outros autores (FJALLBRANT *et al.*, 2007).

A capacidade de produção de IFN- γ *in vitro* tem sido alvo de muitas pesquisas que avaliam a imunidade protetora contra TB, e considerando os resultados de estudos de genética de populações, de pacientes com tuberculose ativa ou latente, estudos em vacinação/revacinação e pesquisas sobre vacinas potencialmente mais eficazes do que a BCG, muitos autores consideram o IFN- γ como um importante parâmetro na busca de marcadores para a avaliação de eficácia em vacinas contra a tuberculose (BLACK *et al.*, 2001; BARRETO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2003; TOSSI *et al.*, 2004; HANEKOM, 2005; WEIR *et al.*, 2008). Observamos que alguns voluntários, tanto no grupo revacinado como no grupo controle, apresentaram produção elevada de IFN- γ (acima de 8000 pg/ml) em resposta ao MtbAg, no tempo zero, antes da intervenção. Isto pode ter ocorrido em virtude de haverem células de memória ainda persistentes nestes indivíduos, que reconhecem antígenos da primo-vacinação. Estudo realizado por Barreto e colaboradores (2005) mostra que a primo-vacinação com BCG, administrada no período neonatal, pode conferir proteção em nosso meio por até 20 anos de idade,

compatível com a faixa etária dos indivíduos avaliados no presente estudo. Outras causas que podem explicar essa produção de citocinas no tempo zero a antígenos micobacterianos incluem a possível infecção recente pelo bacilo da tuberculose e a reatividade inespecífica, pela presença de células de memória com especificidade a antígenos de micobactérias ambientais, que apresentam reação cruzada com a micobactéria tuberculosa (BRANDT *et al.*, 2002; CHILIMA *et al.*, 2006). Apoiando esta última hipótese, no estudo de Weir e colaboradores (2006), comparando adolescentes vacinados do Reino Unido (com proteção vacinal descrita na literatura entre 70-80%) e do Malawi (onde foi demonstrado que a vacina não confere proteção), foi observado que, no Malawi, existe influência de micobactérias ambientais na resposta dos indivíduos vacinados ao PPD de *M. tuberculosis*, e os autores especulam que esse contato prévio pode levar à inibição do efeito protetor da vacina.

Não foi observada diferença significativa entre revacinados e controles na produção *in vitro* das demais citocinas estudadas, em nenhum dos tempos observados. Estes resultados estão de acordo com o encontrado na literatura (BARBOSA *et al.*, 2003; MARCHANT *et al.*, 1999; WEIR *et al.*, 2004). Também os valores de TNF e IL-10 por estímulo *in vitro* permaneceram em geral baixos, apesar de terem sido encontradas respostas elevadas em alguns indivíduos. O estudo anterior do grupo também mostra baixa produção destas citocinas (BARBOSA *et al.*, 2003). Sahiratmadja e colaboradores (2007) observaram aumento de TNF, mas em pacientes TB não tratados correlacionando com inflamação causada pela doença, já que há diminuição durante o tratamento. A produção de IL-6 apresentou-se geralmente elevada nas culturas estimuladas, em todos os tempos de avaliação. Diferente dos nossos achados, Wu *et al.* (2007) observaram em crianças vacinadas com BCG-Moreau-RJ maior produção de citocinas envolvidas na imunidade adaptativa (IL-12/IFN- γ) do que de perfil pró-inflamatório (IL-6/ IL-1/IL-24). São descritas propriedades tanto pró- quanto anti-inflamatórias e estudos em camundongos depletados de IL-6 mostram aumento da suscetibilidade a infecção com Mtb (CREVEL *et al.*, 2006; GUYOT *et al.*, 2006; LADEL *et al.*, 1997). No nosso estudo verificamos correlação entre a produção de IL-6 e TNF e entre TNF e IFN- γ nos revacinados. Em nosso trabalho anterior, com crianças revacinadas, os níveis de IFN- γ não foi associado com TNF ou IL-10. Porém, a produção de TNF nas culturas de sangue total, considerando todas as crianças

revacinadas, no tempo de dois meses após a revacinação, apresentaram correlação significativa com os níveis de IL-10 nas mesmas culturas. Estes resultados mostram que a revacinação pode ser capaz de induzir uma resposta do tipo Th1 com indução de TNF e IFN- γ , citocinas pró-inflamatórias importantes na contenção do bacilo e na formação de clones de memória. Além disso, a correlação entre TNF e IL-6 pode indicar participação de células Th17, devido a capacidade da IL-6 de ativar a produção de IL-17 em conjunto com TNF. Porém, uma resposta do tipo inflamatória pode ser desfavorável a resposta vacinal, impedindo a geração de células de memória.

A partir destes resultados, analisamos a correlação entre TNF e IL-6 nos indivíduos com alta responsividade e com baixa responsividade. Não encontramos correlação entre alto respondedores, porém identificamos correlação significativa entre os baixo respondedores. Provavelmente, nestes indivíduos a revacinação não teria boa resposta protetora. Nós verificamos que houve expansão de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ responsivas aos antígenos micobacterianos em consequência da revacinação. Observamos que houve aumento da proporção destas células no *pool* total de células CD8⁺, embora sem atingir significância estatística, dois meses após a intervenção, e aumento significativo após um ano, restrito ao grupo revacinado. Nos últimos anos, as pesquisas envolvendo linfócitos T CD8⁺ em modelos animais e humanos de TB vêm aumentando, devido à sua importância nas infecções micobacterianas. Camundongos depletados de células T CD4 mostraram aumento de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ e citotóxicas, confirmando sua função efetora no controle da infecção pelo *M. tuberculosis* (TASCON *et al.*, 1998; SERBINA *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 1999). Estudos em recém-nascidos vacinados com BCG também mostraram indução de células TCD8 funcionais e efectoras, tanto com potencial citotóxico, quanto produtoras de IFN- γ , constituindo entretanto funções de populações distintas (MURRAY *et al.*, 2006; HANEKOM, 2005). Soares e colaboradores (2008) avaliando crianças com 10 anos de idade vacinadas no nascimento observaram células TCD4⁺ IFN- γ negativa, expressando IL-2 ou TNF. As células TCD8⁺ também foram capazes de produzir IL-2 na ausência de IFN- γ , mas pouco TNF. Estas pesquisas são importantes para novos modelos vacinais e estudos envolvendo o uso de BCG recombinante expressando Ag85 do *M.tuberculosis* mostrou que a vacina é capaz de estimular e expandir células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específica, além de produzir IFN- γ , inibindo a replicação micobacteriana. Esses estudos

avaliam principalmente a segurança e imunogenicidade da vacina (BROOKES *et al.*, 2008; HOFT *et al.*, 2008). Por outro lado, Wu e colaboradores (2008) sugerem que pode ser desenvolvida uma vacina capaz de estimular e expandir células TCD8⁺ e que estas células são suficientes para mediar proteção contra TB, verificada em experimentos em camundongos imunizados com a vacina de DNA expressando as proteínas CFP-10 e ESAT-6.

É importante considerar que a indução da expansão e proliferação de células T CD8⁺ pode constituir importante mecanismo de defesa contra o bacilo em hospedeiros imunocomprometidos, como em HIV positivos, apresentando deficiência de células TCD4 (KAUFMANN, 2001; FLYNN *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2004).

A persistência da bactéria pode produzir antígeno suficiente para proliferação de células efectoras, mesmo na ausência de geração de memória imunológica (JUNQUEIRA *et al.*, 2004). A exaustão deste *pool* de células T poderia permitir a reativação da doença. Esse mecanismo pode ser responsável pela perda gradual da eficácia da BCG em crianças quando entram na adolescência (BAUMANN *et al.*, 2006).

No nosso estudo, todos os voluntários formaram lesão causada pela revacinação e posterior formação da cicatriz. Porém, não identificamos correlação com a resposta de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ e entre a produção de IFN- γ . Pereira e colaboradores (2003) consideram a leitura da cicatriz vacinal um bom indicador de vacinação e a administração da vacina pode não levar a formação de cicatriz e nem a proteção; ambos possivelmente relacionados à alguns aspectos imunológicos. Os parâmetros imunológicos verificados no nosso estudo não correlacionaram a formação da lesão com a resposta imune, porém foi encontrada correlação perfeita entre o tamanho da cicatriz na primo-vacinação com a cicatriz formada após revacinação.

Entre os voluntários revacinados, não houve homogeneidade na produção de IFN- γ em resposta a vacina. Isso pôde ser evidenciado ao fazermos a estratificação dos voluntários revacinados segundo a magnitude do aumento da produção *in vitro* de IFN- γ , traduzido na razão entre os níveis dessa citocina no tempo de dois meses pós-BCG (T2) e o tempo zero (T0). Pudemos verificar que, nos tempos de dois meses e um ano

pós-BCG, os indivíduos com alta responsividade (com razão T2/T0 acima da mediana) apresentaram resposta significativamente mais elevada do que aqueles com baixa responsividade (com razão T2/T0 abaixo da mediana), os quais não tiveram níveis aumentados desta citocina pós-BCG. Em trabalho anterior do grupo, que avaliou crianças revacinadas entre 7-15 anos, foi também possível verificar uma estratificação, com um grupo de crianças apresentando alta produção de IFN- γ antes da revacinação, e outro grupo com baixa produção dessa citocina no tempo zero. Verificou-se que dois meses após a revacinação com BCG, as crianças que não tiveram boa resposta no tempo pré-BCG tiveram aumento significativo da resposta *in vitro* pós-BCG, ao contrário daquelas que apresentaram produção alta antes da revacinação. Também Nabeshima e colaboradores (2005) verificaram que parte dos indivíduos revacinados, os quais foram denominados “baixo respondedores”, apresentavam pouca produção de IFN- γ dois meses após a revacinação com BCG.

A hiporesponsividade ao *M. tuberculosis*, também chamada anergia, pode ocorrer por fatores ambientais, genéticos ou biológicos, como produção aumentada de IL-10, TGF- β e óxido nítrico. Esses indivíduos são, provavelmente, mais susceptíveis a desenvolver TB, pois não produzem bem IFN- γ em resposta ao bacilo (NABESHIMA *et al.*, 2005). Um estudo avaliando polimorfismo no gene IFN- γ na região +874T/A mostrou que crianças com genótipo TT apresentaram produção aumentada de IFN- γ nas culturas estimuladas com antígeno micobacteriano quando comparadas com crianças com genótipos AT ou AA. A capacidade de montar uma resposta linfoproliferativa, neste caso, não tem influência do sucesso ou falha da vacina, mas da suscetibilidade a doença (ANURADHA *et al.*, 2008).

Avaliando a primo-vacinação, Weir e colaboradores (2008) verificaram a persistência da resposta imune induzida pela vacinação com BCG, com aumento da produção de IFN- γ três meses e um ano pós-vacinação em adolescentes do Reino Unido. Mas, nos adolescentes do Malawi, esse aumento foi observado apenas após 3 meses. Isso pode refletir a capacidade reduzida de gerar resposta de memória devido a alta exposição às micobactérias ambientais (BENETT *et al.*, 2006). Nossos resultados, bem como os resultados da literatura aqui discutidos, apóiam os achados

epidemiológicos, que evidenciam uma heterogeneidade entre as populações na eficácia da vacina BCG contra a tuberculose (BLACK *et al.*, 2002; WEIR *et al.*, 2007).

Explorando os resultados de produção de outras citocinas na comparação entre os indivíduos com alta responsividade e com baixa responsividade, pudemos verificar que no grupo de voluntários com baixa responsividade houve correlação positiva significativa entre a produção de IFN- γ e a produção de TNF. Uma tendência ao aumento da produção *in vitro* de IL-10 no tempo de doze meses pós-BCG também foi observada, apesar de não ser atingida significância estatística. Também no trabalho anterior do grupo com crianças revacinadas (BARBOSA *et al.*, 2003) foi possível demonstrar uma correlação entre os níveis de TNF e de IFN- γ apenas nas crianças com níveis de IFN- γ elevados antes da administração da vacina, as quais coincidem com o grupo sem aumento da resposta de IFN- γ após a revacinação. A produção de TNF estava correlacionada com a produção de IL-10, considerando todas as crianças avaliadas. É interessante notar que produção *in vitro* significativamente elevada de TNF e IL-10 a antígenos micobacterianos foi encontrada em pacientes com TB ativa, em comparação com controles normais ou infectados e com pacientes em cura (SAHIRATMADJA *et al.*, 2007). Barbosa *et al.* (2006) também mostraram que níveis aumentados de TNF e IL-10 no líquido pleural de pacientes com pleurite tuberculosa estavam correlacionados e associados à doença ativa, ao contrário de pacientes com involução espontânea dos sinais e sintomas. Já nos indivíduos com alta responsividade, quanto maiores os níveis de IFN- γ , menores foram os níveis de IL-10. A IL-10 regula negativamente a produção de IFN- γ e níveis aumentados dessa citocina estão associados com piora do estado em pacientes com TB (ELLNER, 1996). Essa interpretação é consistente com os achados de Hanekom (2005) que avaliou cultura de sangue total estimulada com antígenos micobacterianos de crianças da África do Sul vacinadas e encontrou correlação positiva entre IFN- γ e IL-10, no qual sugere um equilíbrio dinâmico entre imunidade efetora e regulatória. Sahiratmadja e colaboradores (2007), também observaram que o aumento da relação entre IFN- γ /IL-10 está significativamente associado à cura da tuberculose em pacientes com TB pulmonar. Não houve diferenças na expansão de células CD8⁺IFN- γ ⁺ quando comparamos os indivíduos com alta e baixa responsividade, o que pode indicar que essa diferenciação afeta principalmente o compartimento CD4⁺. Soares *et al.* (2008) avaliando crianças

vacinadas verificaram que as células CD8⁺ foram menos frequentes do que as CD4⁺ e com maior produção de IFN- γ e IL-2 do que TNF e IL-10, apontando a importância de estudos que avaliem as populações celulares que respondem de forma diferenciada, porém, equilibrada. A nossa hipótese é a de que nos indivíduos com alta responsividade os níveis aumentados de IFN- γ associados aos níveis baixos de TNF, podem suprimir a produção de IL-10, e favorecer uma resposta efetora do tipo Th1. Já nos indivíduos com baixa responsividade a produção de TNF em resposta aos antígenos micobacterianos pode representar a expressão concomitante de uma resposta Th1 e Th17, a qual pode estar relacionada a um aumento da produção de IL-10 por ser relacionada a maior capacidade de dano ao organismo. Essa resposta desregulada, com predisposição a uma resposta inflamatória, pode estar associada a maior suscetibilidade a tuberculose, a qual pode ser inclusive potencializada pela vacina, se nesses indivíduos ela auxilia na expansão de células Th17 e produtoras de IL-10. Um trabalho interessante foi desenvolvido pelo grupo de Qiu (2008) em macacos rhesus com TB severa no qual identificou uma rede de genes responsáveis pelas respostas Th17 e Th1, ativação e migração celular, inflamação e quimioatraentes, sendo que, devido a doença, houve regulação positiva de genes que codificam citocinas inflamatórias e receptores e elementos de ativação imune que não necessariamente ativa uma resposta celular-específica.

A avaliação em conjunto dessas análises imunológicas nos permite entender como essas interações ocorrem no organismo humano. Encontramos nesse estudo que a revacinação é capaz de modular uma resposta do tipo Th1 com participação de IL-6, TNF e IFN- γ e a produção aumentada de IFN- γ em alguns indivíduos revacinados pode significar proteção conferida pela vacina, isto fica mais claro quando avaliamos outros parâmetros imunológicos como a correlação negativa entre IFN- γ e IL-10, mostrando que o IFN- γ suprime uma resposta anti-inflamatória e a observação de que nos indivíduos com baixa responsividade pode haver uma intensa resposta inflamatória que não favorece a manutenção através das células de memória. Estes resultados estão de acordo com a expansão de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ observada nos revacinados, principalmente após um ano, indicando persistência da resposta.

O acompanhamento dos voluntários foi essencial, sendo realizados esforços para não termos grande perdas dos voluntários. A população recrutada no nosso estudo foi homogênea, sendo a seleção realizada em cursos de graduação da área de saúde, abrangendo apenas os dois primeiros semestres. A escolha desta população de estudantes foi importante, já que a revacinação era recomendada aos profissionais da área de saúde e precisávamos de voluntários TST negativo, sem exposição prévia ao *Mycobacterium tuberculosis*, para avaliar a modulação influenciada apenas pela vacina e não por infecção anterior. No ano em que foi iniciado a aplicação da revacinação, a recomendação da descontinuação da vacina ainda não tinha entrado em vigor. As perdas do estudo foram reduzidas pelos contatos informando o local, data e horário para coletas e acompanhamento com dermatologista. Todas as informações acerca da vacina BCG foram informadas aos voluntários e não ocorreram reações adversas à vacinação, o que foi previsível uma vez que foram selecionados indivíduos já expostos à primeira vacinação na infância e sem histórico conhecido de complicações, mas ainda assim, um voluntário manipulou a lesão causada pela vacina e a cicatrização foi mais tardia. Avaliamos em nosso estudo a produção de citocinas antes da revacinação e não encontramos diferenças entre os grupos nas culturas estimuladas com antígenos micobacterianos, porém como nesta etapa o grupo revacinado não recebeu a vacina BCG, não esperava-se diferença na produção de citocinas. Os valores aumentados encontrados na produção de TNF, IL-10, IL-4 e IL-2 nas culturas sem estímulo estão próximos aos limites de detecção, portanto, este aumento pode não ter significado biológico devido a sensibilidade dos kits que são utilizados no estudo em diferentes tempos de avaliação.

7. CONCLUSÃO

1. A revacinação é capaz de modular a resposta imune
2. O *Mycobacterium bovis* BCG é capaz de modular a resposta *in vitro* a antígenos micobacterianos, evidenciada pela produção de citocinas e expansão de células CD8⁺IFN- γ ⁺, de forma persistente, por pelo menos um ano após a administração da vacina.
3. O nosso trabalho mostrou indivíduos do mesmo grupo revacinado que apresentaram melhor resposta a revacinação identificados pela alta produção de IFN- γ , expansão de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ e correlações com citocinas como TNF e IL-10.
4. Alguns indivíduos podem ser beneficiados com a revacinação, através da potencialização e persistência da resposta

Sugerimos que novos modelos vacinais sejam desenvolvidos levando em consideração o importante papel das células CD8⁺IFN- γ ⁺, além do conhecimento de que a resposta é diferenciada na população, portanto, é necessário desenvolver uma vacina que possa abranger indivíduos com infecção latente, já sensibilizados anteriormente com cepa vacinal ou micobactérias atípicas ou ainda com alguma suscetibilidade genética.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, R.; KAPUR, D.; KUMARI, S. Development of BCG scar in relation to the age and nutritional status. **Indian Pediatr**, p. 291-293,1990.
2. ANURADHA, B.; RAKH, S.S.; MURTHY, K.J.; VALLURI, V.L. Interferon-gamma low producer genotype +874 overrepresented in Bacillus Calmette-Guerin nonresponding children. **Pediatric Infect Dis**, v. 27, n. 4, p.325-9, 2008.
3. ARONSON, N.; SANTOSHAM, M.; COMSTOCK, G.; HOWARD, R.; MOULTON, L.; RHOADES, E. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska natives: a 60 -years follow-up study. **Jama**, v.291, n. 71, p. 2086-2091, 2004.
4. BARBOSA, Theolis; ARRUDA, Sérgio; FERNANDES, Bruno D.; CARVALHO, Lucas D.; CARDOSO, Silvia; CUNHA, Sergio; BARRETO, Maurício L.; PEREIRA, Susan; RODRIGUES, Laura C.; BARRAL-NETTO, Manoel. BCG (Bacille of Calmette-Guérin) revaccination leads to improved *in vitro* IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**, v.21, p. 2152-2160, 2003.
5. BARCELOS, W.; MARTINS-FILHO, O.A.; GUIMARÃES, T.M. OLIVEIRA, M.H.; SPÍNDOLA-DE-MIRANDA, S.; CARVALHO, B.N. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. **Microbiol Immunol**, v. 50, n.8, p. 597-605, 2006.
6. BARRETO, Mauricio L.; RODRIGUES, Laura C.; CUNHA, Sergio S.; PEREIRA, Susan; HIJJAR, Miguel; ICHIHARA, Maria Yuri; BRITO, Silvana; DOURADO, Ines. Design of the Brazilian BCG-REVAC trial against tuberculosis: a large, simple, randomized community trial to evaluate the impact on tuberculosis of BCG revaccination at school age. **Controlled Clinical Trials**, v23, p.540-553, 2002.
7. BARRETO, M.L.; CUNHA, S.S.; PEREIRA, S.M.; GENSER, B.; HIJAR, M.A.; YURI, I.M.; BRITO, S.C.; DOURADO, I.; CRUZ, A.; RODRIGUES, L.C. Neonatal BCG protection against tuberculosis lasts for 20 years in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n.10, p. 1171-1173, 2005.

8. BARRETO, Mauricio; PEREIRA, Susan; FERREIRA, Arlan. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination . **Jornal de Pediatria**, v.82, n.3, p.45-54, 2006.
9. BAUMANN, S.; EDDINE, A.N.; KAUFMANN, H.E. Progress in tuberculosis vaccine development. **Current Opinion in Immunology**, v.8, p. 438–448, 2006.
10. BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T.C.; MONTEIRO-MAIA, R.; COSGROVE, C.; CASTELLO-BRANCO, L.R. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n. 5, p. 459-465, 2005.
11. BENNET, A.R.; GORAK, P.S.; BEN, A.S.; FLOYD, S.; LARA, C.M.; WEIR, R.E.; LALOR, M.K.; FINE, P.E.; DOCKRELL, H.M.; BEVERLEY, P.C. The PPD-specific T-cell clonal response in UK and Malawian subjects following BCG vaccination: a new repertoire evolves over 12 months. **Vaccine**, v. 24, n. 14, p. 2617-26, 2006.
12. BEVERIDGE, Natalie E.R.; PRICE, David A.; CASAZZA, Joseph P.; PATHAN, Ansar.; SANDER Clare R.; ASHER, Tedi E.; AMBROZAK, David R.; PRECOPIO, Melissa.; SCHEINBERG, Philip; ALDER, Nicola C.; ROEDERE, Mario; KOUP, Richard A.; DOUEK, Daniel; HILL, Adrian, V.S.; McSHANE, Helen. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis* - specific CD4⁺memory T lymphocyte populations. **Eur. J.Immunol**, v.37, p. 3089-3100, 2007.
13. BLACK, G.F.; FINE, P.E.M; WARNDORFF, D.K.; FLOYD, S.; WEIR, R.E.; BLACKWELL, J.M.; BLISS, L.; MWAUNGULU, L.; CHAGULUKA, S.; JARMAN, E.; NQWIRA, B.; DOCKRELL, H.M. Relationship between IFN-g and skin test responsiveness to *Mycobacterium tuberculosis* PPD in healthy, non-BCG-vaccinated young adults in Northern Malawi. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.5, n.7, p. 664-672, 2001.
14. BLACK, Gilian F.; WEIR, Rosemary E.; FLOYD, Sian; BLISS, Lyn; WARNDORFF, David K.; CRAMPIN, Amelia; NGWIRA, Bagrey; SICHALI, Lifted; NAZARETH, Bernadette; BLACKWELL, Jenefer, M.; BRANSON, Keith; DONOVAN, Linda; JARMAN, Elisabeth; KING, Elizabeth, FINE, Paul; DOCKRELL, Hazel M. BCG- induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial

antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and UK: two randomised controlled studies. **Lancet**, v. 359, 1393-1401, 2002.

15. BECTON DICKINSON PROTOCOL. BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II. **Instruction Manual Cat.551809**, 2001.

16. BRANDT, Lise; CUNHA, Joana Feino; OLSEN, Anja W.; CHILIMA, Ben; HIRSCH, Penny; APPELBERG, Rui; ANDERSEN, Peter. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental Mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infection and Immunity**, v.70, n.2, p.672-678, 2002.

17. BROOKES, R.H.; HILL, P.C.; IBANGA, H.B.; DONKOR, S.A.; HAMMOND, A.S.; MCSHANE, H.; HILL, A.V. Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. **Plos One**, v. 3, n.8. p2921, 2008.

18. CAMARGOS, P.A.; GUIMARÃES, M.D.; ANTUNES, C.M. Risk assessment for acquiring meningitis tuberculosis among children not vaccinated with BCG: a case-control study. **Int J Epidemiol**, v.17, n.1, 193-197, 1988.

19. CAMARGOS, Paulo A.M.; BARRETO, Mauricio L.; ALVIM, Cristina; BEDRAN, Renata. Manter ou suspender a revacinação BCG em adolescentes. **Rev Saúde Pública**, v.40, n.2, p. 318-320, 2006.

20. CAMPOS, Hisbello. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem essa resistência? **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v.7, n.1, 1999.

21. CHEMICAL RUBBER COMPANY. Handbook of biochemistry and molecular biology physical and chemical data. v.1, 3 ed, 1975.

22. CHEON, Seon-Hee; KAMPMANN, Beate; HISE, Amy; PHILIPS, Manijeh; SONG, Ho-Yeon; LANDEN, Katherine; LI, Qing; LARKIN, Rhonda; ELLNER, Jerrold J.; SILVER, Richard; HOFT, Daniel; WALLIS, Robert. Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against Tuberculosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n. 4, p. 901-907, 2002.

23. CHILIMA, B.Z.; CLARK, I.M.; FLOYD, P.E.; HIRSCH, P.R. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga district, northern Malawi. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n.4, p. 2343-2350, 2006.
24. CLIFF, J.M.; ANDRADE, I.N.; MISTRY, R.; CLAYTON, C.L.; LENNON, M.G.; LEWIS, A.P. Differential Gene Expression Identifies Novel Markers of CD4+ and CD8+ T Cell Activation Following Stimulation by Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v.173, p. 485-493, 2004.
25. COLDITZ, G.A.; BERKEY, C.S.; MOSTELLER, F.; BREWER, T.F.; WILSON, M.E.; BURDICK, E. The efficacy of Bacillus Calmette Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. **Pediatric**, v.46, p.26-35, 1995.
26. COWLEY, Siobhan C.; ELKINS, Karen L. CD4+ T cells mediate IFN-g independent control of Mycobacterium tuberculosis infection both *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v.171, p.4689-4699, 2003.
27. CREVEL, R.; KARYADI, E.; PREYERS, F.; LEENDERS, M.; KULLBERG, B.J.; NELWAN, R.H.; VAN DER MEER, J.W. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. **J Infect Dis**, v. 181, n.3, p. 1194-1197, 2000.
28. CREVEL, Reinout van; OTTENHOFF, Tom H.M.; MEER, Jos W.M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p. 294-309, 2002.
29. DOFFINGER, R; PATEL, S; KURUMARATNE, D.S. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. **Current Opinion Rheumatology**, v.17, p. 440-446, 2005.
30. ELLNER, J.J. Immunosuppression in tuberculosis. **Infect Agents Dis**. v. 5, p. 62-72, 1996.
31. FARHAT, M.; GREENAWAY, C.; PAI, M.; MENZIES, D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? **Int J Tuberc Lung Dis**, v.10, p.1192-1204, 2006.

32. FENG, Carl; ANDREW, Bean; HOOL, Helena; BRISCOE, Helen; BRITTON, Warwick. Increase in gamma interferon - secreting CD8, as well as CD4 T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, p.3242-3247, 1999.
33. FERREIRA, Aarlan A.; FERREIRA, Maria de Fátima C.; MACEDO, Edna A.; CUNHA, Ivanise; SANTOS, Susilei L.; REIS, Antonia R.; FORTUNATO, Mariela G.; SIQUINELLI, Angela A.; FIGUEIREDO, Anna B.; MENEZES, Ivana.; MORENO, Wladimir D. BCG revaccination in school children: evolution of the lesion at the vaccination site between 48 hours and 10 weeks. **Journal Pediatric**, v. 78, n.4, p. 289-294, 2002.
34. FIGGE, J.; ROSSING, T.H.; FENCE, V. The role of serum - proteins in acid-base equilibria. **J Lab Clin Med**, v. 117, p.453-467, 1991.
35. FINE, P.; PONNIGHAUS, J.; MAINE, N. The distribution and implications of BCG scars in northern Malawi. **Bull World Health Organ**, v.67, p. 35-42, 1989.
36. FJALLBRANT, H.; RIDELL, M.; LARSSON, L.O. Primary vaccination and revaccination of young adults with BCG: a study using immunological markres. **Scand J Infect Dis**, v.39, n.9, p.792-8, 2007.
37. FLYNN, J.L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; BLOOM, B.R. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med**, v.178, n. 6, p.2249-2254, 1993.
38. GANDLER, W; SHAPIRO, H. Technical tutorial: logarithmic amplifiers. **Cytometry**, v.11, p.447-450, 1990.
39. GRANGE, J.M.; GIBSON, J.; OSBORN, T.W.; COLLINS, C.H.; YATES, M.D. What is BCG? **Tubercle**, p.456-489, 2004.
40. GUYOT-Revil, V.; INNES, J. A.; HACKFORTH, T.; HINKS, T.; LALVANI,A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 173, p. 803-810, 2006
41. HANEKOM, W.A. The immune response to BCG vaccination of newborns.**Ann N Y Acad Sci**, v.1062, p.69-78, 2005.

42. HAWGOOD, B.J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, p. 1241-1258, 1999.
43. HERR, H.W.; MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guérin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **J Urol**, v. 179, n.1, p-53-56, 2008.
44. A HOFT, Daniel F.; BROWN, Robin M.; BELSHE, Robert B. Mucosal Bacille Calmette-Guérin vaccination of human inhibits delayed -type hypersensitivity to purified protein derivative but induces mycobacteria-specific interferon- γ responses. **Clinical Infectious Diseases**, v.30 , p. 217-222, 2002.
45. B HOFT, Daniel F.; WORKU, Shewangizaw; KAMPMANN, Beate; WHALEN, Christopher C.; ELLNER, Jerrold J.; HIRSCH, Christina S.; BROWN, Robin B.; LARKIN, Rhonda.; LI, Qing; YUN, Hyun; SILVER, Richard F. Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of Mycobacterial growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p.1448-57, 2002.
46. HOFT, D.F.; BLAZEVIC, A.; ABATE, G.; HANEKOM, W.A.; KAPLAN, G.; SOLER, J.H.; SADOFF, J.C.; HORWITZ, M.A. A new recombinant Bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis - specific immunity in human volunteers. **J Infect Dis**, 2008.
47. JUNQUEIRA, A.P.; TURNER, J.; GONZALEZ, M.; TURNER, O.C.; ORME, I.M.; Stable T-cell population expressing an effector cellsurface phenotype in the lungs of mice chronically infectedwith *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v.72, p. 570-575, 2004.
48. KAMATH, A.T.; FENG, C.G.; MACDONALD, M.; BRISCOE , H.; BRITTON, W.J. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis.. **Infect Immun**, V. 67, N.4, P. 1702- 1707, 1999.
49. KAUFMANN, S.H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v.1, n.1, p.20-30, 2001.
50. KAUFMANN, Stefan H.E. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells and macrophages. **Ann Rheum Dis**, v. 61, p.54-58, 2002.

51. KAUFMANN, Stefan H.E. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **TRENDS in Immunology**, v.26, n.12, p. 660-668, 2005.
52. KAUFMANN, S. H.; BAUMANN, S.; EDDINE, N. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis** , v.10, n.10, p.1068-1079, 2006.
53. KAUFMANN, Stefan H.E. New issues in tuberculosis. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p.50-56, 2007.
54. KWON, H.H. Distribution and characterization of lactamases of mycobacterial e related organisms. **Tubercule Lung Dis**, v. 76, 141-148, 1995.
55. LADEL, C. H.; BLUM, A.; DREHER, K.; REIFENBERG, M.; KAUFMANN, S. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect. Immun**, v. 65, p.4843–4849, 1997.
56. LEMOS, A.C.; MATOS, E.D.; PEDRAL-SAMPAIO, D.B.; NETTO, E.M. Risk of tuberculosis among household contacts in Salvador, Bahia. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n.6, p. 424-430, 2004.
57. LIU, P.T.; STENGER, S.; HUIYING, L.; WENZEL, L.; TAN, B.H.; KRUTZIK, S.R. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D–Mediated Human Antimicrobial Response. **Science**, v.311, p.1770-1773, 2006.
58. MACHADO, Paulo R.L.; CARVALHO, Lucas; ARAÚJO, Maria Ilma A.S.; CARVALHO, Edgard. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An bras Dermatol**, v.79, n.4, p.647-664, 2004.
59. MAIA, Renata Monteiro; SAMPAIO, Maria B. Ortigao; PINHO, Rosa T.; CASTELLO-BRANCO, Luiz R.R. Modulation of humoal immune response to oral BCG vaccination by Mycobacterium bovis BCG Moreau Rio de Janeiro (RDJ) in healthy adults. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v.4, n. 4, 2006.
60. MALUCELLI, M.; NIERO, R.; LUCCHIARI, P.; SOUZA, P.; BRUZZO, D.; ALVES, R. Evaluation of the polarografhic technique for assay of the viability of freeze-dried BCG vaccine: II Viability of the vaccine assessed by polarograph, Warbug respirometry and colony counting . **Vaccine**, p. 291-293, 1995.

61. MARCHANT, Arnaud; GOETGHEBUER, Tessa; OTA, Martin O.; WOLFE, INGRID; CEESAY, Sering J.; GROOTE, Donat de; CORRAH, Tumani; BENNET, Steve; WHEELER, Jeremy; HUYGEN, Kris; AABY, Peter; McADAM, Keith; NEWPORT, Melanie. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccination. **The Journal Immunology**, v. 163, p.2249-2255, 1999.
62. MARTINEU, A.R.; NEWTON, S.M.; WILKINSON, K.A.; KAMPMANN, B.; HALL, B.M.; NAWROLY, N.; PACKE, G.E.; DAVIDSON, R.N.; GRIFFITHS, C.J.; WILKINSON, R.J. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. **J Clin Invest**, v.117, n.7, p.1988-1994, 2007.
63. MOQUES, T.; GOODRICH, M.E.; RYAN, L.; LACOURSE, R.; NORTH, R.J. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Exp Med**, v. 193, n.3, p. 271-280, 2001.
64. MOSTOWY, Serge; COUSINS, Debby; BRINKMAN, Jacque; ARANAZ, Alicia; BEHR, Marcel. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The Journal Infectious Diseases**, v. 186, p. 74-80, 2002.
65. MOURA, EP; TOLEDO, VPCP; OLIVEIRA, MHP; SPÍNDOLA-DE-MIRANDA, S; ANDRADE, HM; GUIMARÃES, TMPD. Pulmonary tuberculosis: evaluation of interferon- γ levels as an immunological healing marker based on the response to the Bacillus Calmette-Guérin. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, 2004.
66. MYERS, C.A.; SERBINA, N.; KLEIN, E.; TRIEBOLD, K.; BLOOM, B.; FLYNN, J. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. **Journal Immunology**, v.162, p. 5407-5416, 1999.
67. MURRAY, Ann Rose; MANSOOR, Nazma; HARBACHEUSKI, Ryhor; SOLER, Jorge; DAVIDS, Virginia; SOARES, Andreia; HAWKRIDGE, Anthony; HUSSEY, Gregory; MAECKER, HOLDEN; KAPLAN, Gilla; HANEKOM, Willem. Bacillus Calmette-Guérin vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8⁺ T cell response. **The Journal Immunology**, v. 177, p. 5647-5651, 2006.

68. NABESHIMA, Shigeki; MURATA, Masayuki; YAMAJI, Kouzaburo; CHONG, Yong; NAMOTO, Mari; HAYASHI, Jun. Kinetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* - specific cytokine production by PBMC in adults after BCG vaccination. **J Infect Chemother**, v. 11, p.18-23, 2005.
69. NGAI, Patrícia; CORMICK, Sarah; SMALL, Cherrie; ZHANG, Xizhong; ZGANIACS, Anna; AOKI, Naoko; XING, Zhou. Gamma Interferon responses of CD4 and CD8 T cell subsets are quantitatively different and independent of each other during pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection. **Infection and Immunity**, p.2244-2252, 2007.
70. PEREIRA, Susan M; BIERRENBACH, Ana L.; DOURADO, Inês; BARRETO, Maurício L.; ICHIARA, Maria Yuri; HIJJAR, Miguel A.; RODRIGUES, L.C. Sensibility and specificity of the BCG scar reading. **Rev Saúde Pública**, v. 37(2), p. 254-9, 2003.
71. PEREIRA, Susan M; ODIMARILES, Maria Souza Dantas; XIMENES, Ricardo; BARRETO, Maurício L. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Revista de Saúde Pública**, v.41, 2007.
72. QIU L.; HUANG, D.; CHEN, C.Y.; WANG, R.; SHEN, L.; SHEN, Y.; HUNT, R.; ESTEP, J.; HAYNES, B.F.; JACOBS, J.R.; CHEN, Z.W. Severe Tuberculosis Induces Unbalanced Up-Regulation of Gene Networks and Overexpression of IL-22, MIP-1alpha, CCL27, IP-10, CCR4, CCR5, CXCR3, PD1, PDL2, IL-3, IFN-beta, TIM1, and TLR2 but Low Antigen-Specific Cellular Responses. **J Infect Dis.**, v. 23, 2008.
73. RAJA, Alamelu. Immunology of tuberculosis. **Indian J Med Res**, v.120, p. 213-232, 2004.
74. RANI, S.H.; VIJAYALAKSHMI, V; SUNIL, K.; LAKSHMI, K.A.; SUMAN, L.G.; MURTHY, K.J. Cell mediated immunity in children with scar-failure following BCG vaccination. **Indian Pediatric**, v. 35, n.2, p.123-127, 1998.
75. RODRIGUES, L.C.; DIWAN, V.K.; WHEELER, J.G. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta analyse. **Int J Epidemiol**, v.22, p. 454-468, 1993.

76. ROJAS, R.E.; BALAJI, K.N.; SUBRAMANIAN, A.; BOCOM, H.W. Regulation of human CD41 $\alpha\beta$ T Cell Receptor Positive (TCR⁺) and $\gamma\delta$ TCR⁺ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor. **Infection and Immunity**, v.67, n.12, p. 6461-6472, 1999.
77. ROOK, G.A.; HERNANDEZ-PANDO, R; DHEDA, K.; TENG, S.G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. **Trends Immunol**, v.25, n.9, p. 483-488, 2004.
78. ROOK, Graham A.W.; DHEDA, Keertan; ZUMLA, Alimuddin. Immune response ro tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nature Reviews**, v. 5, p.661-667, 2005.
79. ROSENZWEIG, Sergio D.; HOLLAND, Steven M. Defects in the interferon- γ and interleukin-12 pathways. **Immunological Reviews**, v. 203, p. 38-47, 2005.
80. ROTH, Adam; SODEMANN, Morten; JENSEN, Henrik; POULSEN, Anja; GUSTAFSON, Per; WEISE, Christian; GOMES, Justino; DJANA, Queba; JAKOBSEN, Mariane; GARLY, May-lill; RODRIGUES, Amabella; AABY, Peter. Tuberculin reaction, BCG scar an lower female mortality. **Epidemiology**, v.17, p. 562-568, 2006.
81. SAHIRATMADJA, E.; ALISJAHBANA, B.; BOER, T.; ADNAN,I.; CREVEL, R; VOSSE, R.; OTTENHOFF, T.H.; 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**, v.75, n.2, p. 820-9, 2007.
82. SALGAME, Padmini. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 374-380, 2005.
83. SALLES, Cristiane G.; RUFFINO-NETTO, Antonio; LAPA-E-SILVA, José R.; KRITSKI, Afranio L.; CAILLEAUX-CESAR, Michelle; QUEIROZ-MELLO, Fernanda C.; CONDE, Marcus B. The presence of a booster phenomenon among contacts of active pulmonary tuberculosis cases: a retrospective cohort. **BMC Public Health**, v.7, n.38, p.1-5, 2007.

84. SCHLUGER, Neil W. The pathogenesis of Tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 32, p. 251-256, 2005.
85. SESAB. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Citado em 22 de Junho de 2008**. Disponível em www.saude.ba.gov.br
86. SERBINA, Natalya V.; LAZAREVIC, Vanja, FLYNN, Joanne. CD4T Cells are required for the development of cytotoxic CD8T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, p.6991-7000, 2001.
87. SHAPIRO, H.M. Practical flow cytometry. 2nd ed. Wiley-Liss, New York, 1998.
88. SICHLETIDIS, L.; SETTAS, L.; SPYRATOS, D.; CHLOROS, D.; PATAKAS, D. Tuberculosis in patients receiving anti-TNF agents despite chemoprophylaxis. **Int J Tuber Lung Dis**, v.10, n.10, p. 1127-1132, 2006.
89. SIGMA ALDRICH. Citado em 03 de maio de 2008. Disponível em www.sigmaaldrich.com/area_of_interest/The_Americas/Brazil.html.
90. SIMONS, M.P.; O'DONNELL, M.A. GRIFFITH, T.S. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. **Urol Oncol**, v. 26, n.4, 341-345, 2008.
91. SKEIKY, Yasir A.W.; SADOFF, Jerald C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Natures Reviews Microbiology**, v.4, p. 469-476, 2006.
92. SMITH, Stevem M.; MALIN, Adam S.; LUKEY, Paulinet T.; ATKINSON, Sara E.; CONTENT, Jean; HUYGEN, Kris; DOCKRELL, Hazel M. Characterization of Human *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin-Reactive CD8+ T Cells. **Infection and Immunity**, v.67, n.10, p. 5223-5230, 1999.
93. SOARES, Andreia P.; SCRIBA, Thomas J.; JOSEPH, Sarah; HARBACHEUSKI, Ryhor; MURRAY, Rose Ann; GELDERBLOEM, Sebastian J.; HAWKRIDGE, Anthony; HUSSEY, Gregory D.; MAECKER, Holden; KAPLAN, Gilla; HANEKOM, Willem A. Bacillus Calmette-Guérin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. **The Journal of Immunology**, v.180, p.3569-3577, 2008.
94. STARKE, J.R.; CONNELLY, K.K. Bacille Calmette-Guérin vaccine. **Vaccines**, p.456-489, 2004.

95. STEAD, W.W; SENNER, J.W; REDDICK, W.T; LOFGREN, J.P. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **N Engl J Med**, v. 322, n.7, p. 422-427, 1990.
96. STEELE, J.H.; RANNEY, A.F. Animal tuberculosis. **Am Rev Tuberc**, v. 77, n.6, p. 908-922, 1958.
97. STERNE, J.A.; RODRIGUES, L.C.; GUEDES, I.N. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? **Int J Tuberc Lung Dis**, v.2, n.3, p.200-207, 1998.
98. SUTHERLAND, I.; SPRINGETT, V.H. Effectiveness of BCG vaccination in England and Wales in 1983. **Tubercle**, v. 68, n.2, p.81-92, 1987.
99. TASCAN, R.E.; STAVROPOULOS, E.; LUKACS, K.V.; COLSTON, M.J. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8⁺T cells requires the production of gamma interferon. **Infect Immun**, v.66, n.2, p. 830-4, 1998.
100. TESFA, Lydia; KOCH, Franz-Wilhelm; PANKOW, Wulf; VOLK, Hans-Dieter; KERN, Florian. Confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* infection by flow cytometry after ex vivo incubation of peripheral blood T cells with an ESAT-6-derived peptide pool. **Clinical Cytometry**, v. 60B, p.47-53, 2004.
101. TOSSI, Z.; MAYANJA-KIZZAZ,H.; KANOST, A.; EDMONS, K.; MCHUGH, M.;HIRSCH, C. Protective responses in tuberculosis: induction of genes for interferon-g and cytotoxicity by *Mycobacterium tuberculosis* and during human tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, p. 299-306, 2004.
102. VOSKUIL, M. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during environmental conditions associated with latency. **Tuberculosis**, v.84, p. 138-143, 2004.
103. VUKMANOVIC, Milica; REED, John, R.; LACY, Katie E.; RUSTIN, Malcolm, H.A.; AKBAR, Arne, N. Mantoux test as a model for a secondary immune response in humans. **Immunology letters**, v.107, p. 93-101, 2006.
104. WANG, Jun; SANTOSUOSSO, Michael; NGAI, Patrícia; XING, Zhou. Activation of CD8 T Cells by mycobacterial vaccination protects against pulmonary tuberculosis in the absence CD4T cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 4590-4597, 2004.

105. WEIR, R.E.; BLACK, G.F.; NAZARETH, B.; FLOYD, S.; STENSON, S.; STANLEY, C.; BRANSON, K.; SICHALI, L.; CHAGULUKA, S.D.; DONOVAN, L.; CRAMPIN, A.C; FINE, P.E.M.; DOCKRELL, H.M. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon - gamma response to bacille Calmette-Guérin vaccination in southern England and northern Malawi. **Clinical and experimental immunology**, v.146, p.390-399, 2006.
106. WEIR, Rosemary; FINE, Paul E. M.; FLOYD, Sian; STENSON, Sally; STANLEY, Carolynne; BRANSON, Keith; BRITTON, Warwick; HUYGEN, Kris; SINGH, Mahavir; BLACK, Gilian; DOCKRELL, Hel M. Comparison of IFN-gamma responses to mycobacterial antigens as markers of response to BCG vaccination.. **Tuberculosis**, v. 88, p.31-38, 2008.
107. WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. **WHO report** , p. 1-177, 2007. Citado em 06 de agosto de 2008. Disponível em: <http://www.who.int/tb/country/en/index.html>
108. WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. **WHO report** , p. 98-101, 2008. Citado em 06 de agosto de 2008. Disponível em: www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html
109. WORKU, Shewangizaw; HOFT, Daniel F. *In vitro* measurement of protective mycobacterial immunity: antigen-specific expansion of T cells capable of inhibiting intracellular growth of Bacille Calmette-Guérin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n.3, p.257-251, 2000.
110. WU, B.; HUANG, C.; LEON, P. A.; OSOMIO, J.S.; FERREIRA, L.; CANIZALES, S.; SMALL, P.; KATO, M.; CLAYBERGER, C. Unique gene profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* bacille- Calmette-Guerin. **Infect Immun**, v. 75, n.7, p. 658-64, 2007.
111. XAVIER, M.I.; BARRETO, M.L. Tuberculose na cidade de Salvador, Bahia, Brasil: o perfil na década de 1990. **Cad Saúde Pública**, v.23, n.2, p. 445-453, 2007.
112. YOUNG, Sarah L.; SLOBBE, Lynn; WILSON, Rachel; BUDDLE, Bryce; LISLE, Geofferey W.; BUCHAN, Glenn S. Environmental strains of *Mycobacterium tuberculosis* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis*
113. BCG vaccination. **Infection and Immunity**, V. 75, n.6, p.2833-2840, 2007.

ANEXOS

Anexo I

Parecer do Comitê de ética.

ANEXO II

ESTABELECIMENTO DE POTENCIAIS MARCADORES DE PROTEÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA A TUBERCULOSE

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui informado de que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é avaliar a evolução da resposta imune *in vitro* e *in vivo* contra antígenos do bacilo causador da tuberculose e de alérgenos, em indivíduos revacinados com BCG, para identificar parâmetros que possam ser considerados como potenciais marcadores de proteção contra estas doenças.

1. A participação neste estudo envolve o preenchimento de um questionário confidencial, a aplicação do teste tuberculínico antes da revacinação e 1 (um) ano após a revacinação, e a aplicação de um teste cutâneo para alérgenos, bem como a doação de 20 ml de sangue, conforme detalhado abaixo.
2. A duração prevista da minha participação na pesquisa é de um ano até no máximo dois anos. Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão ajudar, no futuro, para a avaliação de novas estratégias vacinais de controle da tuberculose e das alergias. Poderei me beneficiar do conhecimento da minha reatividade a alérgenos comuns associados a alergias respiratórias.
3. Serão realizados os seguintes procedimentos: primeiramente, serei submetido à aplicação de teste tuberculínico (PPD) intradérmico no antebraço. Se o resultado do meu teste for negativo, serei submetido a nova aplicação no intervalo de 1 semana. Em caso de reação negativa em ambos os testes, serei revacinado ou não com BCG. Durante o estudo doarei 20 ml de sangue em cada uma das seguintes etapas: antes da revacinação, 2 meses, 6 meses e 1 ano após a revacinação. Após 1 ano de revacinação, farei um novo PPD, por 2 vezes em intervalos de 1 semana se for negativo.
4. Desde já consinto a realização de todos os tipos de análises hematológicas e sorológicas, dentre estas a **realização do teste de HIV. Consinto também na realização de análises sobre o conteúdo de RNA em culturas do meu sangue.** Consinto também que seja armazenado material biológico, inclusive DNA, para análises posteriores, **com finalidade exclusiva de pesquisa**, ainda que não previstas neste estudo. Estou ciente que para estas utilizações um comitê de ética em pesquisas avaliará o estudo a ser proposto.
5. Os possíveis desconfortos e riscos inerentes aos procedimentos do estudo são aqueles relacionados com a retirada de sangue venoso, aplicação de teste tuberculínico e revacinação com BCG (ver folder). Estas reações adversas foram explicadas pessoalmente e constam do folder que recebi, juntamente com a autorização do serviço de referência para o meu atendimento a qualquer momento durante a minha participação no estudo. Dor local, reações à vacina, e, mais raramente, infecção, podem ocorrer. Os procedimentos referidos são condutas médicas de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.
6. Os voluntários serão randomizados no início do estudo para o recebimento ou não da vacina BCG, e portanto, não posso escolher a que grupo serei designado (revacinado ou não revacinado). A revacinação com BCG em profissionais de saúde é recomendada pelo Ministério da Saúde, e portanto, ao final do estudo será oferecida a oportunidade de revacinação para mim, caso eu seja selecionado para o grupo não revacinado.
7. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes, e quaisquer esclarecimentos estarão disponíveis para mim.
8. Dr. _____ discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas.
9. Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e eu sou livre para recusar participar no estudo, ou me retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
10. Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo cuidadosamente, bem como de tirar todas as minhas dúvidas.
11. Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura:

RG:

Data:

ESTABELECIMENTO DE POTENCIAIS MARCADORES DE PROTEÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA DOENÇAS MICOBACTERIANAS**TERMO DE CONSENTIMENTO**

12. Eu, _____, fui informado de que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é avaliar a prevalência da infecção tuberculosa em universitários da área de saúde em Salvador, bem como estimar o risco de infecção anual entre estes estudantes, fornecendo dados epidemiológicos que possam servir de subsídio para a implementação de medidas de controle e prevenção contra a tuberculose no desenvolvimento das atividades clínicas por estes profissionais.
13. A participação neste estudo envolve o preenchimento de um questionário confidencial e a aplicação do teste tuberculínico, conforme detalhado abaixo.
14. A duração prevista da minha participação na pesquisa é de até dez anos. Os resultados deste estudo podem me beneficiar diretamente, pois permitirão avaliar se estou infectado com o bacilo da tuberculose, e caso eu seja negativo ao teste tuberculínico poderei estar sendo monitorado durante o meu curso quanto à possibilidade de contrair a infecção tuberculosa.
15. Serão realizados os seguintes procedimentos: primeiramente, serei submetido à aplicação de teste tuberculínico (PPD, derivado protéico purificado) intradérmico no antebraço, conforme norma do Ministério da Saúde. Se o resultado do meu teste for negativo, serei submetido a nova aplicação no intervalo de uma semana.
16. Os possíveis desconfortos e riscos inerentes aos procedimentos do estudo são relacionados à aplicação do teste tuberculínico, como coceira no local da aplicação e reação forte ao PPD. Estas reações adversas foram explicadas pessoalmente e constam do folder que recebi, juntamente com a autorização do serviço de referência para o meu atendimento a qualquer momento durante a minha participação no estudo. O teste tuberculínico é uma conduta médica de rotina, recomendada pelo Ministério da Saúde. O teste será realizado por pessoal treinado e experiente, e todos os cuidados apropriados serão tomados.
17. Caso eu apresente reação negativa ao teste tuberculínico após duas aplicações do PPD, será oferecida a mim a oportunidade de participar de um estudo sobre a eficácia da revacinação com o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), vacina contra a tuberculose que recebi na infância. Os voluntários serão randomizados no início do estudo para o recebimento ou não da vacina BCG, e, portanto, não posso escolher a que grupo eu serei designado (revacinado ou não revacinado). A revacinação com BCG em profissionais de saúde é recomendada pelo Ministério da Saúde, e, portanto, caso eu seja selecionado para o grupo não revacinado, terei a oportunidade de escolher se gostaria de ser revacinado após um ano de participação na pesquisa. Todos os esclarecimentos referentes à minha possível participação neste projeto serão dados oportunamente e caso eu aceite participar deste estudo deverei assinar outro termo de consentimento livre e esclarecido, relativo a este projeto específico.
18. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes, e quaisquer esclarecimentos sobre os mesmos estarão disponíveis para mim caso eu manifeste o desejo de obtê-los.
19. Dr. _____ discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas. Se eu tiver novas perguntas eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou entrar em contato com o responsável pelo estudo, Dr. Sérgio Arruda, pelo telefone 3176-2232.
20. Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e eu sou livre para recusar participar no estudo, ou me retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
21. Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo cuidadosamente, bem como de tirar todas as minhas dúvidas.
22. Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura:

RG:

Data:

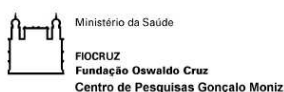
Testemunha:

RG:

Função do estudo:

ANEXO IV

FOLDER



UNIDADE DE HISTOPATOLOGIA (UniH)
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E
MICROBIOLOGIA (LIMI)

**Estabelecimento de potenciais
marcadores de proteção para avaliação
de estratégias vacinais contra
tuberculose.**

Coordenadores: Dra. Theolis Barbosa
Dr. Sérgio Arruda

Suporte: Fundação de Amparo à Pesquisa
da Bahia – FAPESB (Edital PPP)

2008

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a vacinação no período neonatal.

Um estudo epidemiológico nas cidades de Salvador e Manaus para testar a eficácia da revacinação em crianças de 7 a 14 anos demonstrou que nesta população a segunda dose da vacina não tem eficácia.

Vários estudos com voluntários **não infectados** sugerem, no entanto, que nestes indivíduos ocorre significativo aumento da produção de citocinas que podem auxiliar na resposta imunológica contra o bacilo.

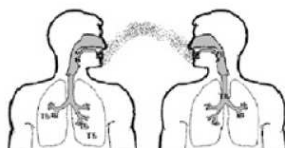
Nossos resultados preliminares mostram que a maioria dos universitários nãoinfectados que foram revacinados com a BCG em Salvador aumenta a produção de interferon-gama, uma importante citocina na resposta imune capaz de eliminar o bacilo.

Nós pretendemos, portanto, avaliar a evolução da resposta imune *in vitro* e *in vivo* contra antígenos micobacterianos em estudantes da área de saúde revacinados com BCG, para confirmar o aumento e a persistência da produção de IFN- γ por estimulação com antígenos micobacterianos nestes indivíduos.

Introdução:

A tuberculose constitui a principal causa infecciosa de mortes em todo mundo. O Brasil é um dos países com maior número de casos novos de tuberculose por ano, e o 2º da América Latina.

O paciente com tuberculose transmite o bacilo responsável pela doença ao tossir ou espirrar, contaminando o ar que é respirado pelos indivíduos ao seu redor.



Os profissionais da área de saúde estão sujeitos a um maior risco de contrair a tuberculose, devido à maior exposição a indivíduos infectados com o bacilo.

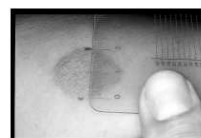
Teste tuberculínico (PPD):

A fim de se avaliar se um indivíduo já foi infectado pelo bacilo utiliza-se o teste tuberculínico.

Procedimentos a serem realizados:

Os voluntários deverão preencher um termo de consentimento para sua inclusão na pesquisa e um questionário para avaliação epidemiológica. Após esta fase os voluntários deverão submeter-se ao teste tuberculínico. Os indivíduos com reação acima de 10mm serão encaminhados para investigação clínica. Os indivíduos PPD negativos serão retestados após cada ano para verificar se houve infecção neste período.

Uma solução contendo proteínas purificadas do bacilo é injetada no antebraço do indivíduo a ser testado. Em algumas horas, se o indivíduo já teve contato com o bacilo, o local de injeção torna-se progressivamente avermelhado e com uma região endurecida.



A endureção no local injetado é medida 48h após a injeção. Os indivíduos que apresentem endureção superior a 10mm são considerados provavelmente infectados pelo bacilo e devem ser encaminhados para investigação de tuberculose. No caso de exame ser negativo, recomenda-se a reaplicação do teste uma segunda vez em um intervalo de uma semana, para confirmação, conforme normas da OMS e do Ministério da Saúde.

Vacinação com BCG:

A vacina atualmente disponível para o controle da tuberculose é o bacilo de Calmette-Guérin (BCG).

Qualquer dúvida sobre o estudo, entrar em contato:

Dra. Theolis Barbosa

Email: theolis@cpqgm.fiocruz.br

Tel: 3176-2264

Dr. Sérgio Arruda

Email: arruda@cpqgm.fiocruz.br

Tel: 3176-2232

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
FIOCRUZ-Bahia
Rua: Waldemar Falcão, 121. Brotas

Dr. Jamocyr Marinho

Email: pneumohsi@uol.com.br

Serviço de Pneumologia

Hospital Santa Isabel

Tel: 2108-4654

Pça. Cons. Almeida Couto, 500. Nazaré

ANEXO V

Questionário

ESTUDO DA REVACINAÇÃO COM BCG

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Voluntário n°: 001

Data: ___/___/___

Nome _____

Data do Nascimento: _____

Curso _____ Instituição _____ Semestre: _____

Endereço residencial: _____

Endereço eletrônico (e-mail): _____

Telefone: _____

Celular: _____

ESTUDO DA REVACINAÇÃO COM BCG

Voluntário n°:

001

I- NÍVEL SÓCIO-ECONÔMICO E FATORES DE RISCO (questionário 1)

1- A qual gênero (sexo) você pertence?]

() Masculino () Feminino

2- Qual a sua idade? _____

3- Qual o total de rendimentos da sua família?

() até 1 salário mínimo () entre 5 a 10 salários mínimos

() entre 1 a 2 salários mínimos () entre 10 a 20 salários mínimos

() entre 2 a 5 salários mínimos () mais de 20 salários mínimos

4- Tem ou teve contato com pessoas com tuberculose?

() Não () Sim

5- Qual o grau de contato?

() Na residência () Pacientes () Escola () Trabalho

() Familiares ou relações próximas fora da residência () Outros. Qual? _____

6- Esse contato com paciente com tuberculose foi:

- diário diário intermitente semanal
 quinzenal eventual não sabe informar

7- Foi vacinado com BCG?

- Não Sim Não sabe

8- Teve alguma reação adversa quando foi vacinado com BCG?

- Não Sim Não sabe

9- Já foi internado para realização de alguma cirurgia?

- Não Sim

Se a resposta for sim, qual o tipo de cirurgia? _____

10- Já está freqüentando hospitais ou outros serviços de atendimento como estagiário?

- Não Sim

II- Avaliação nutricional (questionário 2):

1- Qual o seu peso? _____

2- Altura? _____

3- O que costuma comer nas refeições?

- arroz feijão carne de boi peixe
 carne de frango verduras legumes

4- Perdeu mais de 10% de peso nos últimos 12 meses?

- Não Sim

5- Nos últimos seis meses chegou a ter diarreia por mais de 30 dias?

- Não Sim

III- ESTADO GERAL DE SAÚDE (questionário 3)

1. Já teve ou tem tuberculose?

- Não Sim

2. Algum médico já lhe disse que você tinha asma ou bronquite ou bronquite alérgica?

- Não Sim

Se a resposta foi sim, especificar o ano: _____

3. Já teve algum problema nos pulmões?

- Não Sim

Se a resposta foi sim:

Em que ano? _____

Qual o problema? _____

Qual o diagnóstico? _____

Que tratamento foi feito? _____

Que remédios tomou? _____

Que especialista o atendeu? _____

4. Nas últimas semanas teve ou vem tendo tosse?

() Não () Sim

se a resposta foi não passe para a questão 6.

5. Há quanto tempo vem tendo tosse? _____

6. Teve febre nas últimas semanas?

() Não () Sim

7. Tem sudorese excessiva durante a noite

() Não () Sim

8. Tem Diabetes?

() Não () Sim

9. Usa insulina?

() Não () Sim

10. Tem ou teve algum tipo de câncer?

() Não () Sim

11. Tem ou teve algum tipo de alergia?

() Não () Sim

12. Faz uso de algum medicamento?

() Não () Sim

Se a resposta foi sim, qual e há quanto tempo?

13. Faz uso de corticóides?

() Não () Sim

Se a resposta foi sim, Qual? _____

14. Faz uso de medicações controladas?

() Não () Sim

Se a resposta foi sim, qual e há quanto tempo? _____

15. Faz exame de fezes regularmente?

() Não () Sim

16. Quando foi realizado o último exame? _____

17. Já apresentou resultado positivo?

() Não () Sim

Se a resposta foi sim, qual o(s) parasita (s)? _____

18. Você é hemofílico?

() Não () Sim

19. É doador de sangue?

() Não () Sim

20. Tem tatuagem no corpo?

() Não () Sim

21. Já fez algum tratamento de hemodiálise?

() Não () Sim

22. Recebeu alguma transfusão de sangue?

() Não () Sim

IV- Tabagismo, Alcoolismo e uso de drogas ilícitas (questionário 4):

1. Fuma?

() Não () Sim

2. Qual a quantidade diária?

() 1-5 cigarros () 5-10 cigarros () 10 a 15 cigarros
() 15 a 20 cigarros () mais de 20 cigarros

3. Qual o tipo de fumo?

() cigarro () charuto () outros. Qual? _____

4. Faz uso de bebidas alcoólicas?

() Não () Sim

Se a resposta foi sim, Quais? _____

5. Qual a frequência semanal de uso de bebidas alcoólicas?

() 1 vez/mês () 1 vez por semana () mais de 1 vez/semana
() diariamente

6. Faz uso de drogas injetáveis?

Não Sim

Se a resposta foi sim, qual? _____

V- Atividade sexual (questionário 5):

1. Com quantos parceiros manteve relações sexuais nos últimos doze meses?

0-1 2 3-5 6-10

11-20 mais de 20

2. Já teve alguma doença sexualmente transmissível?

Não Sim

Se a resposta foi sim, qual foi a doença? _____

3. Já fez teste de HIV ou HTLV?

Não Sim

Se a resposta foi sim, há quanto tempo foi feito o teste e qual foi o resultado? _____

Questionário de doenças respiratórias (questionário 1)

1- Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?

Sim Não Não sabe

2- Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)?

Sim Não Não sabe

3- Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

nenhuma crise 1 a 3 crises 4 a 12 crises

mais de 12 crises Não sabe

4- Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve o sono perturbado por chiado no peito?

nunca acordou com chiado menos de 1 noite por semana

uma ou mais noites por semana Não sabe

5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?

Sim Não Não sabe

6) Alguma vez na vida você teve asma?

Sim Não Não sabe

7- Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

Sim Não Não sabe

8- Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

Sim Não Não sabe

Questionário de doenças respiratórias (questionário 2)

1- Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado?

Sim Não Não sabe

Se a resposta foi não, passe para a questão 6

2- Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?

Sim Não Não sabe

Se a resposta foi não, passe para a questão 6

3- Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

Sim Não Não sabe

4- Em qual dos últimos (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu)

Janeiro Fevereiro Março Abril

Maio Junho Julho Agosto

Setembro Outubro Novembro Dezembro

Não sabe

5- Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?

Nada Um pouco Moderado Muito

Não sabe

6- Alguma vez na vida você teve rinite?

Sim

Não

Não sabe

Questionário de doenças respiratórias (questionário 3)

1- Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?

Sim Não Não sabe

Se a resposta foi não, passe para a questão 6.

2- Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?

Sim Não Não sabe

Se a resposta foi não, passe para a questão 6.

3- Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?

Sim Não Não sabe

4- Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos últimos 12 meses?

Sim Não Não sabe

5- Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?

Nunca nos últimos 12 meses Menos de 1 noite por semana

Uma ou mais noites por semana Não sabe

6- Alguma vez você teve manchas com coceira (eczema)?

Sim

Não

Não sabe