



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

**FLÁVIA DE ARAÚJO SENA**

**PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO PPD E  
PELO EXTRATO DE *Mycobacterium bovis* EM  
ADOLESCENTES ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE  
SALVADOR, BAHIA**

Salvador, BA

2015

**FLÁVIA DE ARAÚJO SENA**

**PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO PPD E  
PELO EXTRATO DE *Mycobacterium bovis* EM  
ADOLESCENTES ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE  
SALVADOR, BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves

Salvador, BA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,  
**Sistema de Bibliotecas da UFBA**

---

S474 Sena, Flávia de Araújo.

Perfil de citocinas induzidas pelo PPD e pelo extrato de *Mycobacterium bovis* em adolescentes atópicos e não atópicos de Salvador, Bahia / Flávia de Araújo Sena. - Salvador, 2016.

93 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara Neves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2016.

1. Alergia e Imunologia. 2. Imunomodulação. 3. *Mycobacterium bovis*. 4. Teste tuberculínico. I. Neves, Neuza Maria Alcântara. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

CDU: 577:579

---



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



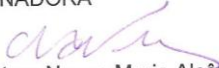
TERMO DE APROVAÇÃO

"Perfis de Citocinas Induzidas pelo PPD e pelo Extrato de Mycobacterium bovis em Adolescentes Atópicos e não Atópicos de Salvador, Bahia"


Mestranda Flávia de Araujo Sena  
Orientadora - Profa. Dra. Neuz Maria Alcântara Neves

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Imunologia.


BANCA EXAMINADORA

  
Professora Doutora Neuz Maria Alcântara Neves  
PPGIm/ICS-UFBA

  
Professora Doutora Joice Neves Reis Pedreira  
ICS-UFBA

  
Professor Doutor Jamocyr Moura Marinho  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública- EBMS

Salvador, 15 de dezembro de 2015

  
Profa. Dra. Sílvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm  
ICS-UFBA

À minha família por ter acreditado em mim. Ao meu pai pela segurança que me deu ao longo do caminho. À minha mãe pelo apoio e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e à Meishu-Sama pela permissão de poder iniciar e finalizar o trabalho e por iluminarem a minha trajetória durante esta caminhada

Agradeço à minha família. Aos meus pais pelo exemplo e suporte que me deram durante toda a minha vida. Às minhas irmãs pelo companheirismo. Às minhas sobrinhas pelo amor puro e incondicional para mim dispensado

À minha orientadora, Dra, Neuza Maria Alcântara Neves pela oportunidade de desenvolver o trabalho, bem como pela paciência e incentivo

Aos professores do programa por terem compartilhado seus conhecimentos e contribuído para o meu amadurecimento

Aos meus colegas do Laboratório de Alergia e Acarologia, eu não poderia ter encontrado pessoas melhores para passar os últimos dois anos. Em especial à Alana, Emília e Samara pelos momentos de trabalho, discussões, conversas e distrações

Aos meus amigos, obrigado pelo apoio e cumplicidade

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e à Universidade Federal da Bahia

À todos, a minha sincera gratidão

Aprender por aprender é estudo morto, enquanto aprender algo para ser utilizado na sociedade é estudo vivo.

Meishu-Sama, 1949

## RESUMO

**Introdução:** Têm-se debatido o papel de microrganismos na imunomodulação de doenças alérgicas atópicas cuja prevalência tem aumentado. A Micobactéria emerge, então, como um potencial agente imunomodulador. **Objetivo:** Identificar os perfis de citocinas induzidos pelo extrato de *Mycobacterium bovis* e pelo PPD e como elas são induzidas em adolescentes atópicos e não atópicos de Salvador, Bahia. **Metodologia:** O estudo utilizou amostra de conveniência de 55 indivíduos cujo sangue periférico coletado fora utilizado no cultivo de sangue total. As células foram estimuladas com 5µg do extrato de *M. bovis* ou 5µg do PPD. Utilizou-se o Multiplex para verificar o perfil de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , IL-13, IL-5 e IL-17) induzido em 24h. A atopia foi determinada através da presença de IgE acima de 0,7 kU/mL para pelo menos um alérgeno (*Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus*, *Blatella germanica* e *Periplameta americana*). A amostra foi dicotomizada em respondedor e não respondedor com base no limite mínimo de detecção do kit para cada citocina e o teste Exato de Fisher foi aplicado. **Resultados:** O estímulo com PPD e com extrato induziu mudanças significativas nas frequências de respondedores à IL-5, IL-13 e IL-17, e à IL-5, IL-13, IL-17 e IFN $\gamma$ , respectivamente. 97,7% dos indivíduos foram produtores de IL-10 em resposta ao extrato. Os compostos não induziram alterações significativas nas frequências de respondedores entre os grupos de atopia. **Conclusão:** As dosagens de citocinas serão finalizadas, incluindo-se a do sobrenadante de 120h, permitindo a aplicação de teste estatístico com maior poder para verificação dos efeitos dos compostos utilizados.

**Palavras-chave:** Alergia e Imunologia. Imunomodulação. *Mycobacterium bovis*. Teste tuberculínico



## ABSTRACT

**Introduction:** The role of microorganisms in immunomodulation of atopic allergic diseases whose prevalence has increased has been discussed. Mycobacteria emerges as a potential immunomodulatory agent. **Objective:** Identify the cytokine profile induced by *Mycobacterium bovis* extract and PPD and how they are induced in adolescents atopic and non-atopic from Salvador, Bahia. **Methodology:** This study used a convenience sample of 55 individuals. Peripheral blood samples were used in the whole blood culture. The cells were stimulated with 5µg of *M. bovis* extract or 5µg of PPD. Multiplex was used to verify cytokine profile (IFN $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , IL-13, IL-5 e IL-17) induced in 24h. Atopy was determined by the presence of IgE above 0.7 kU / mL for at least one allergen (*Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus*, *Blattella germanica* e *Periplameta americana*). The sample was dichotomized into responder and non-responder based on the minimum limit of kit detection for each cytokine and Fisher's Exact Test was applied. **Results:** The stimulation with PPD and with the extract induced significant changes in the frequency of responders to IL-5, IL-13 and IL-17, and the frequency of responders to IL-5, IL-13, IL-17 and IFN $\gamma$ , respectively. 97,7% of subjects were producers of IL-10 in response to the extract. The compounds did not induce significant changes in the frequency of responders between atopy groups. **Conclusion:** Cytokines dosages will be finalized including the 120h supernatant, allowing the application of statistical analysis with the largest verisimilitude as the power and verify the effects of these compounds used.

**Keywords:** Allergy and Immunology. Immunomodulation. *Mycobacterium bovis*. Tuberculin test

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização da população do estudo

TABELA 2 – Citocinas produzidas por células do sangue total de 21 indivíduos estimuladas ou não pelo PPD

TABELA 3 – Citocinas produzidas por células do sangue total de 55 indivíduos estimuladas ou não pelo extrato de *Mycobacterium bovis*

TABELA 4 – Citocinas produzidas espontaneamente por células do sangue total nos indivíduos atópicos e não atópicos

TABELA 5 - Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com PPD em indivíduos atópicos e não atópicos

TABELA 6 - Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com extrato de *Mycobacterium bovis* em indivíduos atópicos e não atópicos

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Albumina-Dextrose-Catalase
AKT	Serina-Treonina quinase
APRIL	Ligante Indutor de Proliferação
BAFF	Fator de Ativação das Células B
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CR3	Receptor 3 do Complemento
CTLA-4	Proteína 4 Associada ao Linfócito T Citotóxico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ESAT-6	6kDa Alvo Antigênico Precocemente Secretado
FAP	Fator Ativador de Plaquetas
Fc	Fragmento Cristalizável
FcεRI	Receptor de Alta Afinidade para IgE
FcεRII	Receptor de Baixa Afinidade para IgE
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HLA-E	Antígeno Leucocitário Humano E
IDO	Idoleamina (2,3)-Dioxigenase
IFN-γ	Interferon Gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G1
IL-10	Interleucina 10
IL-12p40	Subunidade de 40kDa da Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
ILC	Célula Linfoide Inata
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1 $\alpha$	Proteína Inflamatória de Macrófagos – 1 alfa
MPT83	Lipoproteína <i>M. tuberculosis</i>
NKT	Células T Natural Killer
NTM	Micobactérias não Pertencentes ao Complexo <i>M. tuberculosis</i>
OVA	Ovalbumina
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PPD	Derivado Proteico Purificado
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpf	Fatores Promotores de Ressurreição
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SCAALA	Social Changes in Asma and Allergies in Latin America
SDS-PAGE	Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida
sIgE	IgE específica
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SPT	Skin Prick Test
SSI	Statens Serun Institut
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- $\beta$	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1	Atopia.....	16
2.2	Os microrganismos na atopia e em doenças alérgicas .....	21
2.3	Micobactérias.....	24
2.4	Micobactérias na atopia e em doenças alérgicas .....	29
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES DO ESTUDO</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
4.1	Objetivo geral .....	33
4.2	Objetivos específicos.....	33
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
5.1	Caracterização da população de estudo .....	34
5.2	Inquérito epidemiológico de 2013 .....	34
5.3	Inquérito sorológico .....	35
5.4	Obtenção do PPD e do extrato de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	35
5.5	Cultivo de células sanguíneas.....	36
5.6	Quantificação de Citocinas.....	37
5.7	Dosagem de IgE e definição de atopia .....	37
5.8	Análise estatística.....	38
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIA</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>70</b>
	ANEXO A - Tabela 1: Caracterização da população do estudo .....	70
	ANEXO B – Tabela 2: Dados de atopia .....	71
	ANEXO C – Tabela 3: Citocinas produzidas espontaneamente por células do sangue total nos indivíduos atópicos e não atópicos .....	72
	ANEXO D - Tabela 4:Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com extrato de <i>Mycobacterium bovis</i> em indivíduos atópicos e não atópicos .....	73
	ANEXO E – Tabela 5: Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com PPD em indivíduos atópicos e não atópicos .....	74
	ANEXO F – Tabela 6: Citocinas produzidas por células do sangue total de 55 indivíduos estimuladas ou não pelo extrato de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	75

ANEXO G – Tabela 7: Citocinas produzidas por células do sangue total de 21 indivíduos estimuladas ou não pelo PPD .....	76
ANEXO H: Manuscrito do artigo .....	77
ANEXO I: Comprovante da Aprovação do Conselho de Ética .....	91

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A prevalência de doenças alérgicas tem aumentado em todo o mundo (ASHER, *et al*, 2006, LIAO, *et al*, 2009; DECKERS, *et al*, 2012; PAPADOPOULOS, *et al*, 2012). Em determinadas regiões da América Latina chega a ser tão alta quanto aquelas encontradas em regiões desenvolvidas. Sintomas de rinite alérgica, por exemplo, em crianças de 6-7 anos, apresentaram, no Reino Unido, no Japão e no Canadá, prevalências de 10,1%, 10,6% e 10,8%, respectivamente, enquanto que, dentre os países da América Latina, com exceção do México cuja prevalência foi de 7,2%, todos (Brasil, Chile, Costa Rica e Panamá) apresentaram este índice acima de 11% (ASHER, *et al*, 2006). A asma, por exemplo, que acomete por volta de 300 milhões de pessoas no planeta, sendo a doença crônica de maior prevalência em crianças nos países em desenvolvimento (STRANNEGARD, STRANNERGARD, 2001; MARTIN, TAUBE, 2012), teve o maior aumento da prevalência na América Latina nas últimas décadas – 0,32% ao ano para adolescentes (ASHER, *et al*. 2006; SOLÉ, *et al*, 2013).

No Brasil, as tendências de prevalência das doenças alérgicas não são homogêneas. A prevalência da rinite, por exemplo se manteve estável no país no decorrer dos inquéritos epidemiológicos do ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) fase I e fase III, mas, em algumas regiões, essa prevalência diminuiu, enquanto outras (São Paulo e Porto Alegre) ela aumentou. Por esse motivo, embora uma tendência para diminuição dos sintomas das doenças alérgicas tenha sido observada, os dados variam de acordo com o local onde se coleta. A prevalência de asma no Brasil (46,9%), entretanto, ainda é uma das maiores da América Latina (SOLÉ, *et al*, 2006).

Os tratamentos disponíveis para as doenças atópicas, como os corticosteróides, possuem efeitos colaterais, tornando-os preocupantes, principalmente nos indivíduos com manifestações graves que necessitam de altas doses e por tempo prolongado (SMIT, *et al*, 2003). As doenças alérgicas constituem uma condição que diminui a qualidade de vida do indivíduo afetado (PAPADOPOULOS, *et al*, 2012). Esta interfere na sua saúde mental e nas suas atividades sociais – escola, trabalho, família (CHIDA, 2008). Além disso, o seu custo é alto para o paciente e para o sistema público de saúde. No Brasil, somente a asma representa a quarta maior causa de hospitalização pelo SUS (Sistema Único de Saúde) o que resulta em uma despesa de

US\$ 52 milhões/ano. O indivíduo portador de asma grave chega a custar R\$ 2.838,33/ano para a sociedade (DAMASCENO, *et al*, 2012).

Strachan (1989) postulou a hipótese da higiene, a qual preconiza que a diminuição das infecções assim como o uso de antibiótico, as vacinações da infância, ocasionados pelo maior desenvolvimento sócio-econômico, poderiam afetar o balanço da resposta imune acarretando o aumento das doenças imunomediadas. A partir daí, houve uma mudança drástica de pensamento na comunidade científica. Os agentes que antes eram tidos como vilões, tais como os agentes etiológicos de infecções crônicas adquiridas após o nascimento desde vírus a helmintos causadores de infecções persistentes, passaram a ser vistos como prováveis educadores do sistema imune do indivíduo e o seu contato na infância protegeria aqueles com predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas (STRACHAN, 2000; ROOK, *et al*, 2013). Algumas vacinas, como a tríplice bacteriana e a BCG (Bacilo Calmette-Guérin), emergiram como potenciais agentes no combate às alergias (SMIT, *et al*, 2003; MARTIGNON, *et al*, 2005). *Mycobacterium* emerge, então dentre os organismos que evoluíram acompanhando a humanidade (GAGNEUX, 2012) e que, por esse motivo, poderia desempenhar um papel importante na modulação do sistema imune do hospedeiro.

O papel da vacinação pela BCG, e da infecção assintomática por *Mycobacterium* spp na proteção contra o desenvolvimento das doenças atópicas tem sido debatido. Estudos epidemiológicos sobre a associação entre a vacinação pelo BCG e proteção contra atopia ou doenças alérgicas divergem bastante quanto aos achados; alguns encontram ação protetora (AABY, *et al*, 2000; CAVALLO, *et al*, 2002; GARCIA-MARCOS, *et al*, 2005 apud ANOLDUSSEN, *et al*, 2010) enquanto outros não a acham (GRÜBER, *et al*, 2001; ANNUS, *et al*, 2004). No Brasil, o estudo epidemiológico de Cunha, *et al*, 2004, na Bahia encontrou associação entre presença de cicatriz da vacinação pelo BCG e a redução de alergia. Há, portanto, uma grande variedade de estudos que visam elucidar o papel efetivo que as micobactérias têm na imunomodulação das alergias, e até o momento seus resultados são controversos. O presente trabalho buscou, através do estímulo das células do sangue periférico de indivíduos atópicos e não atópicos com componentes da micobactéria, entender como as células imunes do hospedeiro respondem ao estímulo e se essa resposta difere entre os indivíduos atópicos e não atópicos



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Atopia

O termo “atopia” foi utilizado inicialmente por Coca e Cooke (1922) para distinguir os diferentes tipos de hipersensibilidade. A origem da palavra é grega e significa “algo fora do lugar”. A expressão foi empregada para remeter à hipersensibilidade, que ocorria em determinados indivíduos, ao contato com antígenos ambientais. No presente, atopia é definida como uma tendência pessoal e geneticamente determinada que alguns indivíduos possuem de serem sensibilizados e produzirem anticorpos IgE contra antígenos ambientais inócuos para indivíduos não atópicos (WAO/EAACI).

A reação de hipersensibilidade tipo I, é mediada pela imunoglobulina IgE, ligada principalmente aos mastócitos (RAJAN, 2003) e basófilos. A asma brônquica, o eczema, e a rinite alérgica se encontram entre as manifestações clínicas que se associam à atopia (RING, 1991). Rothers *et al*, 2011, encontrou, em seu trabalho, que o aumento dos níveis de IgE específica, em crianças, era acompanhado pelo aumento da prevalência de asma na população de estudo. Indivíduos que possuem histórico familiar de atopia têm mais chance de desenvolver sensibilização por IgE e esse estado de atopia representa um maior risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas (WAO, 2003). As alergias são na maioria causadas por reação de hipersensibilidade tipo 1, que pode ser mediada tanto por anticorpos quanto por células, sendo a IgE o principal isotipo de anticorpo envolvido no processo alérgico (WAO/EAACI). Anticorpos da subclasse IgG1 também podem mediar essa reação de hipersensibilidade em camundongos mas tal fenômeno não foi ainda detectado em seres humanos (GOULD, *et al*, 2003).

O aumento da IgE se dá principalmente em resposta à infecção parasitária, sendo um componente da resposta imune adaptativa contra esses agentes infecciosos (WAO, 2003; BURTON, OETTGEN, 2011).

Todos os indivíduos têm capacidade de produzir anticorpos IgE, mas enquanto os não atópicos o fazem de forma específica a partir da exposição a um potente alérgeno em altas doses, os indivíduos atópicos respondem de forma prolongada com a produção do anticorpo mesmo durante uma exposição mínima ao alérgeno (PEPYS, 1975 apud RING, 1991). A atopia é então, a predisposição genética de produzir altas

concentrações de anticorpo IgE após contato com alérgeno incapaz de suscitar estas reações em indivíduos não atópicos (WAO/EAACI). Indivíduos atópicos podem ter os níveis de anticorpos IgE na circulação que chegam a ser cerca de dez vezes mais altos que os valores normais ( ~150ng/mL). A meia vida desta imunoglobulina no soro é curta mas ela pode aumentar sua vida ao se ligar aos receptores Fc de alta afinidade (FcεRI) dos mastócitos (GOULD, *et al*, 2003) e basófilos. Os plasmócitos produtores de IgE podem ser encontrados nos linfonodos peritoneais e brônquicos assim como nos centros germinativos e mucosas respiratória e intestinal (ISHIZAKA, 1976).

A maioria dos alérgenos tem a estrutura proteica globular. Dentre as moléculas que podem potencialmente sensibilizar o organismo, encontram-se as proteínas derivadas de plantas e de invertebrados (AALBERSE, *et al*, 2001). A depender do órgão onde ocorreu a sensibilização e a exposição subsequente, a hipersensibilidade imediata apresentará diferentes manifestações clínicas que variam desde o eczema atópico, passando para rinite, broncoespasmo, diarreia induzida por alimentos, até anafilaxia (BURTON, OETTGEN, 2011). Sintomas e sinais como secreção de muco, espirro, tosse, prurido, broncoconstricção, produção de lágrima, vômito e diarreia, edema de glote e choque anafilático estão presentes na alergia induzida pela IgE (WAO, 2003).

O mecanismo envolvido no desenvolvimento da atopia não está relacionado com as reações de tudo ou nada, ele é, ao contrário, um fenômeno processual (RING, 1991). Há um envolvimento de diversos agentes que vão desde células epiteliais, microrganismos a ela associados, células e moléculas da resposta imune inata, incluindo nesta categoria os TLRs (Receptores do tipo Toll) e células NKT (Células T Natural Killer) (UMETSU, DEKRUYFF, 2011; WINGENDER, *et al*, 2011) e as células linfoides inatas (ILCs), até as influências do genoma do hospedeiro (PAPADOPOULOS, *et al*, 2012). Diversos genes e seus polimorfismos têm sido demonstrados estarem robustamente associados com asma (MARCH, *et al*, 2013).

As doenças alérgicas apresentam classicamente um desequilíbrio entre as respostas Th1/Th2 bem como uma imunorregulação, mediada pelas células T regulatórias deficientes havendo o predomínio das citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), como evento que antecede a síntese de IgE (STRANNEGAËRD, STRANNEGAËRD, 2001; ROOK, BRUNET, 2005). Esta é, entretanto, uma forma simplificada de explicar a patogênese dessas doenças. Já é sabido que outras respostas, como a Th17, Th9 e Th22 estão envolvidas no desenvolvimento das alergias (SOROOSH, DOHERTY,

2009; BESNARD, *et al*, 2011; GITTNER, *et al*, 2012; PAPADOPOULOS, *et al*, 2012).

O processo inicial envolve a sensibilização do indivíduo, ou seja, deve haver o contato prévio com o alérgeno, e no momento que isto ocorre as células apresentadoras de antígenos o internalizam, processam-no e passam a apresentá-lo em sua superfície (WAO, 2003). A exposição a peptídeos em baixas concentrações, como tipicamente ocorre com a maioria dos alérgenos, leva ao incompleto acúmulo das moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade). Esses epítopos são apresentados aos linfócitos T e essa fraca apresentação de antígenos permite a ativação de linfócitos T auxiliares do subconjunto Th2, produtores de IL-4. A porta de entrada do alérgeno também entra neste contexto. Sabe-se, por exemplo, que os antígenos quando administrado pelas vias respiratórias são mais imunogênicos e detêm mais chances de induzir doenças alérgicas de vias aéreas do que àqueles administrados pela via oral (CORRY, KHERADMAND, 1999; PABST, MOWAT, 2012). A tolerância oral desempenha um papel na homeostase do organismo uma vez que este mecanismo atenua a resposta imune contra os diversos antígenos proteicos presentes na dieta (PABST, MOWAT, 2012).

Quando os linfócitos Th2 estimulados pelo alérgeno interagem com os linfócitos B, estes mudam seu isotipo de anticorpo passando a secretar IgE (WAO, 2003; GALLI, *et al*, 2008). As citocinas IL-4 e IL-13 fazem-se importantes nesse contexto uma vez que estimulam a produção de IgE e de muco induzindo inflamação (COFFMAN, *et al*, 1986; FINKELMAN, *et al*, 1988, MINTY, *et al*, 1993). O desenvolvimento das doenças alérgicas se dá com a produção em paralelo de IL-4 e IL-13 (CORRY, KHERADMAND, 1999). Uma vez na circulação, a IgE liga-se ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) presente em mastócitos e basófilos ou ao de baixa afinidade (FcεRII) expresso por diversos tipos de células imunes incluindo os linfócitos B (GEHA, *et al*, 2003; GALLI, *et al*, 2008).

A reação imediata tipo I, que ocorre após a exposição secundária ao alérgeno, pode ser dividida em reação imediata, a qual, como a nomenclatura sugere, é de curta duração e ocorre imediatamente após o contato com o alérgeno e resulta na liberação de mediadores liberados por mastócitos no órgão afetado ou basófilos no sangue, e em reação tardia, a qual ocorre posteriormente e é caracterizada pelo influxo de diversas células como eosinófilos, monócitos, linfócitos T e B (GOULD, *et al*, 2003).

A ligação cruzada do alérgeno a um número suficiente de IgE específica presente nos receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos e basófilos leva à inicialização da reação imediata de hipersensibilidade tipo I. A ativação destas células leva a degranulação e consequente liberação de mediadores pré-formados (histamina, proteoglicanos, carboxipeptidase A, quimases, serinoproteases) e recém sintetizados, incluindo prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas e citocinas como MIP-1 $\alpha$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 (GOULD, *et al.*, 2003; WAO, 2003; GALLI, *et al.*, 2005; LARCHÉ, 2007; OGAWA, GRANT, 2007; PEAVY, METCALFE, 2008). Esses eventos levam à vasodilatação, com consequente aumento da permeabilidade vascular, edema, broncoconstrição e inflamação dos brônquios ou outros órgãos afetados. (GALLI, *et al.*, 2008).

Muitos desses mediadores estão envolvidos no estabelecimento do quadro clínico desenvolvido. A histamina, por exemplo, é responsável pela vasodilatação e secreção glandular, os leucotrienos e as prostaglandinas possuem ação broncoconstrictora (PEAVY, METCALFE, 2008). Outros mediadores liberados promovem o recrutamento local e ativação de leucócitos o que contribui para o desenvolvimento de reações da fase tardia (GALLI, *et al.*, 2008).

A ativação de mastócitos e basófilos pode ser suficiente para criar um ambiente Th2 permissível à diferenciação dos linfócitos T *naïves* para linfócitos Th2 com sua posterior expansão clonal (LARCHÉ, 2007). A reação pode ser local, causando crise de asma e de rinite, ou pode ser sistêmica, culminando com a anafilaxia (GALLI, *et al.*, 2008).

A fase tardia da reação alérgica é caracterizada pelo recrutamento de mais mastócitos, basófilos, eosinófilos e células T CD4<sup>+</sup> Th2 para o sítio onde ocorreu a exposição ao alérgeno. O eosinófilo também libera uma cascata de mediadores inflamatórios (como a proteína básica principal, proteína catiônica, fator ativador de plaquetas - FAP, leucotrienos, IL-3, IL-5, IL-8) amplificando a resposta inflamatória (FULKERSON, ROYHENBERG, 2013; MELO, *et al.*, 2013). A liberação de citocinas Th2 (particularmente a IL-5) leva ao recrutamento de eosinófilos e a IL-4 e IL-13 atuam estimulando a produção de IgE. Estas são as principais citocinas envolvidas no processo alérgico (LARCHÉ, 2007; OGAWA, GRANT, 2007). Nos pulmões essas reações são caracterizadas pela redução do lúmen dos bronquíolos e hipersecreção de

mucosa, refletindo o recrutamento local e ativação de células Th2, eosinófilos, basófilos e outros leucócitos e pela produção persistente dos mediadores oriundo das células residentes. Os mediadores que iniciam as reações da fase tardia são oriundos dos mastócitos residentes ativados pela IgE ligada ao alérgeno e de células T que reconhecem os peptídeos derivados do antígeno (GALLI, *et al*, 2008).

Embora a tenacidade da ligação entre a IgE e o FcεRI dos mastócitos seja um fator importante, é a contínua síntese e secreção de IgE local que mantém a sensibilização dessas células. Os novos anticorpos formados substituem então a IgE que foi perdida por dissociação, difusão ou degradação (GOULD, *et al*, 2003). Os mastócitos conseguem, também, manter um número razoável dos receptores de alta afinidade em sua superfície que podem ligar-se à IgE regulando a sua expressão, provavelmente em resposta à IgE circulante (WAO, 2003).

Os mastócitos e demais células inflamatórias e seus produtos secretados e excretados induzem mudanças vasculares que resultam no influxo e ativação de células inflamatórias da fase tardia nos sítios de provocação pelo alérgeno (GOULD, 2003) de maneira que, com o tempo, as exposições repetidas ao alérgeno leva ao remodelamento dos tecidos afetados, particularmente o remodelamento brônquico (GALLI, TSAI, 2012). O microambiente das mucosas nos indivíduos alérgicos também parece favorecer a síntese de IgE (GOULD, 2003). A IgE específica para o alérgeno amplifica as respostas Th2 alérgeno-específicas e vice-versa, a resposta Th2 amplifica a IgE específica para o alérgeno (LARCHÉ, 2007). A reatividade alterada, aumento da produção de IgE juntamente com a desregulação das células T permite a manutenção desse processo (RING, 1991).

Embora a reação de hipersensibilidade tipo I, mediada por IgE tenha um papel importante na patogênese das doenças alérgicas em muitos pacientes, esta não é, entretanto, uma verdade aplicável a todos os casos. Há uma grande parcela de indivíduos com manifestações clínicas das doenças alérgicas, mas que apresentam reação cutânea de hipersensibilidade (SPT – skin prick test) negativa e não possuem IgE específica para alérgenos detectável no soro (pelo menos para os alérgenos investigados) (RING, 1991). Em outros esta imunoglobulina só é detectável nas secreções do órgão afetado o que remete à sua produção local, neste caso a asma é considerada como tendo o fenótipo não atópico (GOULD, *et al*, 2003).

É sabido que grande parte da IgE é encontrada localmente nos órgãos onde ocorrem as desordens características das doenças alérgicas o que leva à crença de que estes sítios correspondem a nichos onde os plasmócitos têm vida longa e que a IgE medida na circulação periférica corresponde ao anticorpo que escapa desses sítios (COËFFIER, *et al*, 2005). A IgE produzida localmente pode relacionar-se mais com as doenças alérgicas consideradas erroneamente como não atópicas, quando esse anticorpo não é detectado no sistema sanguíneo (TAKHAR, *et al*, 2007).

Sabe-se que algumas moléculas podem induzir a mudança de classe da IgE e produção de IL-4 de maneira independente das células T. O corticosteroide hidrocortisona, o fator de ativação das células B (BAFF), o ligante indutor de proliferação (APRIL), a infecção pelo vírus *Epstein barr* e a proteína de ligação ao componente C4 do complemento (C4BP) são exemplos de componentes que induzem a produção de IgE independente de célula T (GEHA, *et al*, 2003). O termo atopia não deve ser usado até que uma sensibilização por IgE tenha sido documentada por anticorpos IgE específicos para alérgenos no soro ou por um teste cutâneo positivo para alérgenos (WAO/EAACI).

## **2.2 Os microrganismos na atopia e em doenças alérgicas**

Apesar do conhecimento acerca da associação entre atopia, susceptibilidade genética e doenças alérgicas, o rápido crescimento da incidência dessas doenças na população mundial nos últimos 50 anos não é compatível com mudanças no genoma humano. Isto induz à ideia de que fatores ambientais estariam contribuindo para o aumento da prevalência destas enfermidades (LARCHÉ, 2007; MARTIN, TAUBE, 2012).

Tendo como base a história evolutiva do ser humano, foi postulado que o desenvolvimento da hipersensibilidade tipo I foi importante para proteger nossos ancestrais dos parasitos (MARSH, *et al*, 1980). O fato de que as respostas alérgicas afetam, em geral, a pele, o intestino e o trato respiratório os quais correspondem aos principais sítios de invasão parasitária, corrobora com essa suposição (WAO, 2003). Com a melhoria das condições sanitárias, tem sido observada a diminuição das ocorrências de infecções parasitárias, principalmente no que tange as regiões mais desenvolvidas. A alta prevalência de doenças atópicas é justificada então pela manutenção dessa função imune anteriormente fundamental (MARSH, *et al*, 1980).

Em 1989, David Strachan, baseado em evidências epidemiológicas, demonstrou que o declínio do tamanho da família juntamente com o aumento do padrão de limpeza dos ambientes estava relacionado com o aumento da incidência das doenças atópicas (STRACHAN, 1989) e postulou a “hipótese da higiene” a qual representa uma quebra do paradigma há muito estabelecido de que as infecções constituiriam um fator que funcionaria como um estímulo à sensibilização alérgica e não o contrário (STRACHAN, 2000). A hipótese traz, então, a ideia de que um ambiente mais sujo, ou mais propenso à contaminação por agentes, conseguiria modular o sistema imune do hospedeiro mediante a dicotomia das respostas Th1 – Th2 (STRACHAN, 2000). Dentro desse contexto, outras hipóteses foram formuladas, muitas, inclusive, complementares à hipótese da higiene.

A “hipótese dos velhos amigos” leva em conta o fato de que muitos agentes, tais como helmintos, organismos comensais e algumas micobactérias, estão evolutivamente relacionados aos mamíferos e o contato com eles, o qual estaria diminuído na época atual, possibilitaria o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro favorecendo o desenvolvimento de células T regulatórias e a produção da IL-10 e do TGF- $\beta$  (ROOK, BRUNET, 2005). A ausência do contato com estes organismos resultaria, conseqüentemente, em defeitos na regulação do sistema imune, o que se manifestaria como uma série de doenças incluindo as doenças autoimunes e as alergias (ROOK, *et al*, 2013). A hipótese da biodiversidade relaciona a diminuição desta com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas e, as alergias estão incluídas neste contexto. Diferentemente da hipótese da higiene, aqui há a inclusão do meio ambiente, em geral, com os seres vivos que o compõe (VON HERTZEN, *et al*, 2011). Aparentemente a perda da biodiversidade do ecossistema associado ao corpo humano, é um fator que contribui para o aparecimento de doenças alérgicas (PARKER, OLLERTON, 2013).

Foram observados, em alguns estudos que infecções por vírus do sarampo, hepatite A e bactérias como *Helicobacter pylori* e micobactérias, tem efeito protetor contra alergia, enquanto que outros agentes, como o vírus sincicial respiratório e a *Bordetella pertussis* (agente causal da coqueluche) estão associados à um maior risco de desenvolvimento de alergias (STRACHAN, 2000; VON MUTIUS, 2001). A eficiência das infecções acima citadas em conferir proteção contra doenças alérgicas incide em sua capacidade de induzir imunorregulação no hospedeiro (ROOK, *et al*, 2013).

Diversos grupos têm tentado encontrar, em suas populações de estudo, evidências que corroborem com essas hipóteses. Foi visto, por exemplo, que crianças que são expostas a um ambiente rural têm menos chance de desenvolver asma e atopia em relação àquelas que não foram expostas (ERNST, CORMIER, 2000). Dentre os fungos, os extratos de candidina e tricofitina estimularam, em células mononucleares do sangue periférico, o aumento da produção de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e, tanto no grupo saudável quanto no dos indivíduos alérgicos, as citocinas do perfil Th2 (IL-5 e IL-13) não foram estimuladas (MORENO-AMOR, *et al*, 2014).

Em relação às infecções parasitárias, estudos mostram que elas têm capacidade de inibir a hiperresponsividade das vias respiratórias, aumentar a produção de IL-10 e induzir o desenvolvimento de células T regulatórias (SCHNOELLER, *et al*, 2008; TURNER, *et al*, 2008; PACÍFICO, *et al*, 2009; LARSON, *et al*, 2012; RODRIGUES, *et al*, 2008). Essas características, entretanto, variam de organismo para organismo. O *Nippostrongylus brasiliensis*, por exemplo, passa parte do seu ciclo nas vias respiratórias e durante esse período induz algumas mudanças teciduais, trata-se de mudanças morfológicas e alterações na expressão de proteínas. Concomitante a isso, após sua saída das vias respiratórias, é notada uma redução de doenças alérgicas em modelo murino (REECE, *et al*, 2008). Por outro lado, infecção por ancilostomídeos se associa com diminuição de atopia e manifestações alérgicas, possivelmente secundárias a inflamação crônica associada a uma resposta tipo Th2 modificada que cursa com menor produção de citocinas Th2 e aumento de citocinas regulatórias (McSORLEY, MAIZELS, 2012; MAIZELS, *et al*, 2014)

Na população onde o presente estudo foi realizado, observou-se uma menor produção de citocinas características tanto do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ) quanto do perfil Th2 (IL-5, IL-13) e uma maior produção da IL-10 quando a condição de renda era mais desfavorável (FIGUEIREDO, *et al*, 2011). A infecção crônica por *Ascaris lumbricoides* em crianças e por *Trichuris trichiura* está relacionada a uma maior produção de IL-10 em relação àquelas que não estão infectadas cronicamente. A infecção recorrente pelos parasitos estava, entretanto, associada a uma maior produção de citocinas características do perfil Th2 (IL-5, IL-13) (FIGUEIREDO, *et al*, 2010). Enquanto isto, na fase aguda destas infecções, em crianças abaixo de 4 anos de idade, a IgE anti-*A. lumbricoides* e a presença de ovos de *T. trichiura* foram mais fortemente associados ao desenvolvimento de atopia (ALCANTARA-NEVES, *et al*, 2010).



Foi também observado nesta população, que a soropositividade para o *Toxoplasma gondii* estava inversamente associada à produção de IgE específica sérica e à menor hipersensibilidade cutânea. Infecções por *Ascaris lumbricoides*, *T. trichiura*, vírus herpes simplex e vírus Epstein-Barr foram inversamente associados à resposta positiva ao SPT (ALCANTARA-NEVES, *et al*, 2012). Evidências de que o contato com alguns vírus e bactérias tem efeito benéfico em relação à alergia, têm sido encontradas, ainda que nem sempre haja um consenso do efeito protetor, ou não, que o organismo possui. A vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) ou a infecção pelo sarampo, por exemplo, têm sido associadas ao aumento de doenças atópicas (PAUNIO, *et al*, 2000; OLESEN, *et al*, 2003), porém, a tríplice viral, também foi associada a um quadro clínico de asma com menor hospitalização e uso de medicamentos (HVIID, MELBYE, 2008).

Algumas bactérias têm emergido como organismos com potencial imunomodulatório. Foi constatado que o *Lactobacillus casei* pode inibir a fase efetora da inflamação e inibir a ativação de mastócitos e basófilos (SCHIFFER, *et al*, 2011). Indivíduos saudáveis apresentaram maior diversidade de gamaproteobactérias e maior expressão de IL-10 (PBMC) em relação aos atópicos. Neste grupo de estudo, a abundância da gammaproteobactéria *Acinetobacter* sp apresentou associação estatisticamente significativa com a produção de IL-10 (HANSKI *et al*, 2012; FYHRQUIST *et al*, 2014).

### **2.3 Micobactérias**

O gênero *Mycobacterium* é amplamente distribuído no meio ambiente o que evidencia sua capacidade de adaptação a ambientes extremos. Embora no laboratório suas espécies sejam organismos fastidiosos, na natureza elas são capazes de sobreviver em ambientes nutricionalmente pobres além de apresentarem certa resistência a temperaturas mais elevadas (FALKINHAM, 2003). Algumas destas bactérias podem ser agentes etiológicos de doenças em humanos ou em animais (FALKINHAM, 1996).

A parede celular das micobactérias é composta de peptidoglicanos, polissacarídeos, glicolipídeos e lipídeos, principalmente o ácido micólico, o que lhes conferem uma barreira hidrofóbica que serve como proteção. Os bacilos são imóveis e não encapsulados. Apesar de não formar esporos, as micobactérias podem entrar em um estado não replicativo. Nestas condições, apresentam baixa atividade metabólica e

aumento de resistência às drogas. A coloração utilizada para visualizá-las é a coloração de Ziehl-Neelsen que caracteriza estes organismos como álcool-ácido resistentes (CAMPOS, 2006; GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012).

No que se refere às micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (NTM) é sabido, há algum tempo, da sua presença em aerossóis, no solo, nos alimentos, na água (doce ou salgada) e na água tratada. A resistência ao cloro durante o tratamento da água permite a sua replicação na água potável sem a presença de outras bactérias para competir por recursos alimentares (COLLINS, *et al*, 1984; COVERT, *et al*, 1999; DANTEC, *et al*, 2002; THOREL, *et al*, 2004).

Apesar da maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* pertencer ao grupo das bactérias não patogênicas (COSMA, *et al*, 2003), há uma grande variedade de espécies que infectam humanos. *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* correspondem às espécies que acomete humanos e são patógenos exclusivos; outras espécies como *M. avium*, *M. kansasii*, *M. simiae* e *M. haemophilum*, dentre outros, correspondem a espécies oportunistas (RASOGI, *et al*, 2001) que ocasionam doenças em hospedeiros imunodeficientes. As micobactérias patogênicas são adaptadas para estabelecer infecções de longo período de duração (COSMA, *et al*, 2003).

A evidência mais antiga da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em humanos refere-se ao seu encontro em múmias dos egípcios (CAVE, 1939). Em 2009, ao se realizar análise de DNA em um corpo pertencente a um indivíduo que viveu na época de Jesus Cristo, foram encontradas evidências de que o homem sofria de lepra e morreu de tuberculose (GIBSON, 2009). Foi hipotetizado que o primeiro ancestral comum das micobactérias que formam o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, e *M. microti*) (COSMA, *et al*, 2003) teve origem no continente africano e a espécie bem-sucedida foi disseminada para o resto do mundo (GUITIERREZ, *et al*, 2005). A observação de que a distribuição mundial de algumas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* relaciona-se a áreas particulares e que a maioria dessas cepas é encontrada também ou exclusivamente na África corrobora com esta hipótese (GAGNEUX, *et al*, 2006; HERSHBERG, *et al*, 2008). É estimado um período de 2,6 milhões de anos que o bacilo teve para atingir a atual diversidade genética encontrada, o que sugere que este gênero tenha surgido há mais de 3 milhões de anos (GUITIERREZ, *et al*, 2005). Essas diferentes espécies do gênero *Mycobacterium* se adaptaram às condições das diversas populações humanas

que lhes serviam de hospedeiros (GAGNEUX, S. *et al*, 2006), co-evoluindo com a humanidade (GANGNEUX, 2012).

As espécies que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis* são os agentes etiológicos da tuberculose, doença infecciosa que acomete principalmente os pulmões. A tosse configura-se como o principal sintoma podendo ser produtiva com presença, ou não, de sangue. A febre no final da tarde, sudorese noturna, anorexia e emagrecimento também constituem sintomas da doença na sua forma pulmonar (Ministério da Saúde, 2014). A vacina desempenha um importante papel na prevenção das formas graves de tuberculose nas crianças, mas não tem tanta influência nos adultos o que, por sua vez, resulta na manutenção da transmissão da bactéria na população. O desenvolvimento da doença está ainda ligado a fatores do indivíduo como desnutrição, alcoolismo, doenças crônicas e quadros de imunossupressão (GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012).

A partir da primeira exposição ao *Mycobacterium tuberculosis* uma série de respostas imunes são montadas e estas não são uniformes, variam de acordo com o indivíduo. Numa infecção primária, o bacilo pode ser eliminado pelo sistema imune do hospedeiro, desenvolver uma infecção latente ou levar a instalação da doença (GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012). Após entrar no pulmão do hospedeiro através da inalação de aerossóis contendo a bactéria, o bacilo irá interagir com vários receptores que compõe a imunidade inata, tais como TLR, receptor 3 do complemento (CR3), receptor de manose, receptor *scavenger*, dentre outros (DHEDA *et al*, 2010).

De maneira geral, uma vez implantada nos alvéolos pulmonares, ocorre a formação do complexo de Ghon com a disseminação da bactéria pelos linfonodos pulmonares. Uma vez estabelecida no tecido pulmonar, a necrose é iniciada. Durante esse processo a bactéria interage com diversas células como células dendríticas, macrófagos e pneumócitos. A bactéria e seus componentes interagem com os linfócitos T CD4+ sensibilizados o que desencadeia a liberação de citocinas inflamatórias (SMITH, 2003; ORME, 2014). As células T CD4+ podem ser diferenciadas em Th1, Th2, Th17 e Treg. As células Th1 CD4+ montam uma resposta mediada, principalmente, pelo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, linfotoxina e GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos) que, por sua vez, estimula as células Th1, os linfócitos T citotóxicos e a maturação e ativação de macrófagos e granulócitos (DHEDA *et al*,

2010). A resposta adaptativa em indivíduos saudáveis tende a controlar o agente, mas não o elimina (GEHRING, *et al*, 2004).

A *Mycobacterium tuberculosis* podem residir nos fagossomos de macrófagos. A maturação desses fagossomos é perigosa para a bactéria uma vez que uma série de substâncias bactericidas são produzidas tornando o ambiente hostil para o patógeno. O mecanismo utilizado pelo organismo para impedir a maturação do macrófago e a eliminação da infecção não é conhecido. Esta ineficiência dos macrófagos em eliminar a bactéria resulta na formação dos granulomas. O bacilo dentro do macrófago ou em um granuloma não consegue sair e infectar outro sítio ou outro hospedeiro; são os bacilos presentes nas cavidades necróticas que o faz. É postulado que na estrutura granulomatosa, o bacilo apesar de não se replicar, continua viável e pode permanecer assim por um longo período (SMITH, 2003; ORME, 2014).

A lepra é uma doença crônica causada pela infecção por *Mycobacterium leprae*. O organismo tem tropismo pela pele e nervos periféricos e, como resultado, há a perda da sensibilidade nas lesões quando os nervos sensoriais cutâneos são afetados. Trata-se da causa mais comum de neuropatia periférica não traumática. A rota mais provável de transmissão se dá pela pele ou pela mucosa nasal. Uma vez que a bactéria infecta as células nervosas, os macrófagos e as células de Schwann, ela pode danificar os nervos através da resposta inflamatória produzida, lesões nas células de Schwann e lesões inespecíficas que podem induzir disfunções vasculares, devido á isquemia (SCOLLARD, 2000; BHAT, PRAKASH, 2012).

As manifestações clínicas da doença varia desde a forma tuberculóide, na qual o hospedeiro tende a apresentar uma resposta celular eficaz, resultando na formação do granuloma e um quadro clínico com poucas lesões e bacilos, até o seu oposto, ou seja, aquele indivíduo que não monta uma resposta celular eficaz, evolui com a forma lepromatosa, ou virchowiana, onde há uma alta carga de bacilos e formação de lesões (SCOLLARD, 2000). Aparentemente a resposta imune deste último quadro clínico apresenta um perfil de citocinas predominantemente do tipo Th2 (BHAT, PRAKASH, 2012).

O *M. leprae* é adaptado para sobreviver por longos períodos dentro do hospedeiro e consegue entrar em um estado de dormência onde há baixo metabolismo e ausência de replicação o que o torna mais resistente a ação de antibióticos e ao próprio ambiente

pobre em nutrientes do granuloma no qual ele está contido. Sua reativação relaciona-se com uma série de genes denominados de fatores promotores de ressurreição (Rpf) (GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012).

As funções básicas dos granulomas, presentes em ambas patologias, são controlar a disseminação do agente bem como a inflamação induzida pela resposta imune e permitir a contínua apresentação de antígenos bacterianos para as células do sistema imune do hospedeiro (ALGOOD, *et al*, 2005). Em humanos eles podem se apresentar como granulomas sólidos, necróticos ou caseosos (GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012). Essas estruturas são ricas em macrófagos diferenciados, células gigantes, células epitelióides, linfócitos T  $\gamma\delta$ , linfócitos restritos ao CD1, linfócitos T CD8+, havendo predominância de células T CD4+ no sítio de lesão com rara presença de bactéria. Há uma resposta imune com o perfil Th1 com produção de IFN- $\gamma$ , TNF e teste cutâneo positivo. O TNF $\alpha$  é um importante fator no estabelecimento e manutenção do granuloma (KAUFMANN, 2002; MENDONÇA, *et al*, 2008; BHAT, PRAKASH, 2012).

No granuloma os linfócitos T ativam os macrófagos infectados, mas esse evento não é eficiente, uma vez que algumas bactérias permanecem viáveis, embora, em sua maioria, elas se encontrem no estado de dormência com baixo metabolismo (ALGOOD, *et al*, 2005). Trata-se de uma lesão bem organizada com presença de diferentes populações de células a depender do local dentro do granuloma em que é encontrado. Os linfócitos T CD4+, por exemplo, se concentram no centro do granuloma, enquanto que os linfócitos T CD8+ são mais comumente encontrados na sua periferia (GOULART, *et al*, 2002; GENGENBACHER, KAUFMANN, 2012).

A infecção por micobactérias resulta, classicamente, na indução de diversas quimiocinas e citocinas, havendo um desvio para a produção de citocinas características do perfil Th1 (KAUFMANN, 2002; ALGOOD, *et al*, 2005). Além do desvio para uma resposta Th1, a vacinação pela BCG bem como a infecção do indivíduo pela bactéria resulta no estímulo de células T regulatórias (KAUFMANN, *et al*, 2005). Crianças vacinadas ao nascer, apresentaram maiores frequências de células T CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$ , BCG-específica e, apesar de não significativo, a capacidade dessas crianças de expressar IL-2, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foi maior do que naquelas vacinadas com seis semanas de vida. Em contrapartida, neste último grupo

foi observado uma maior indução de IL-10 (LUTWAMA, *et al*, 2014). Dessa maneira, no que tange a vacinação, o aumento de IL-10 pode ser prejudicial uma vez que o indivíduo não montaria uma resposta eficaz contra o agente, o aumento da citocina posterior a vacinação seria acompanhado pela diminuição da resposta Th1 específica contra o agente.

Durante a infecção, as micobactérias podem imunomodular a resposta do indivíduo através da indução da produção de IL-10 por células dendríticas, macrófagos e células T, mediada por TLRs, mais especificamente o TLR2 (MOUTINHO, 2011) e o TLR3; este último utiliza a via de sinalização PI3K/AKT (Fosfatidilinositol-3-quinase/Serina-Treonina quinase) (BAI, *et al.*, 2014). O antígeno ESAT-6 (6kDa Alvo Antigênico Precocemente Secretado) do *Mycobacterium tuberculosis* está envolvido em mecanismos de supressão de macrófagos e células T e na indução de IL-10 (SAMTEN, *et al*, 2011).

Weiner, e colaboradores (2012) descreveram alguns dos biomarcadores da tuberculose. Eles mostraram que a enzima idoleamina (2,3)-dioxigenase (IDO), encontrava-se elevada, tanto em camundongos com tuberculose experimental, quanto em células dendríticas derivada de monócitos e macrófagos de humanos com esta patologia. A IDO está envolvida na catalisação da quebra do triptofano em quinurenina e foi descrita como supressora de células T (MELLOR, MUNN, 2004; MUNN, *et al*, 2004). No mesmo trabalho, estes autores relataram a diminuição da proliferação das células tratadas com o PPD (Derivado Proteico Purificado), juntamente com os lipídios da parede da bactéria, em relação àquelas em que o inibidor da 1metil-DL-triptofano (1-MT-DL) foi adicionado à mistura (WEINER *et al.*, 2012).

#### **2.4 Micobactérias na atopia e em doenças alérgicas**

Um possível tratamento para resolução das doenças alérgicas seria o desvio do perfil Th2, predominante nos indivíduos acometidos por essa condição, juntamente com a indução de células T regulatórias através do uso de espécies de micobactérias (BARLAN *et al*, 2006; AKKOC *et al*, 2014). Um dos primeiros trabalhos que evidenciou a provável ligação entre a infecção ou exposição por micobactéria e a redução do risco de alergia foi do grupo de Shirakawa T., *et al*, em 1997. Esse estudo

contou com a participação de 867 crianças, tendo sido encontrado uma associação inversa entre a positividade do teste tuberculínico com sIgE e perfil de citocinas Th2 (SHIRAKAWA *et al*, 1997). Os modelos murinos têm-se mostrado promissores em relação à proteção conferida por micobactérias contra atopia e doenças alérgicas. Estudos mostram a redução da hiperresponsividade das vias respiratórias, do infiltrado celular, da produção de muco e de sIgE, assim como a indução de IL-10 e expressão de Foxp3 e CTLA-4 (KOH *et al*, 2000; LAGRANDERIE *et al*, 2008; GOUVEIA *et al*, 2013; KIM *et al*, 2014), além da redução de citocinas características do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (SAMARY *et al*, 2013).

O *Mycobacterium vaccae* inibiu os níveis de IL-5 e suscitou maiores níveis de IL-10 nos filhotes dos camundongos tratados com OVA (Ovalbumina) (AKKOC *et al*, 2014). O tratamento de camundongos com BCG reduziu a inflamação das vias respiratórias induzida pela OVA, bem como a infiltração celular, a produção de muco, os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA e das citocinas IL-4 e IL-13, concomitante a isso, houve aumento de IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e de células Foxp3<sup>+</sup> e CTLA-4<sup>+</sup> (GOUVEIA *et al*, 2013). A utilização dos constituintes do organismo também mostrou efeito promissor na indução de células T regulatórias, desvio do perfil Th2 e redução de neutrofilia em modelo murino de asma (KIM *et al*, 2014; TSUJIMURA *et al*, 2014).

Os achados acima sugerem que infecções por micobactérias protegem contra atopia e sensibilização alérgica, muito embora em humanos, alguns estudos, não tenham encontrado nenhuma associação destas infecções com sensibilização alérgica (YILMAZ *et al*, 2000; NUHOGLU *et al*, 2003). Alm *et al*, 1998, não encontrou diferença entre a prevalência de atopia entre indivíduos que receberam e não receberam a vacinação pela BCG. De maneira semelhante, Krause *et al*, 2003, não encontrou diferença nos níveis de IgE entre indivíduos vacinados e não vacinados com a BCG.

Outros trabalhos, entretanto, mostraram efeitos benéficos de micobactérias e seus componentes em seres humanos. Há uma grande pluralidade de trabalhos que relaciona o BCG, o *M. bovis*, a reatividade do teste tuberculínico, a infecção pelo *M. tuberculosis* com a atopia (BARLAN *et al*, 2006). A presença de *M. tuberculosis* no estado de latência em indivíduos foi associada ao aumento da expressão de células T regulatórias (HERZMANN, 2012); enquanto que a positividade do teste tuberculínico

em crianças foi associada com uma menor frequência de rinite atópica e as infecções pelas micobactérias foram relacionadas a uma menor positividade ao SPT (OBIHARA *et al*, 2005) e à proteção contra a asma (FISHER-LIGHTER, PENG, 2012). Também foi encontrado que, após a vacinação pelo BCG ocorria a diminuição de IgE total e IgE-alérgeno específica (CAVALLO *et al*, 2002), aumento da função pulmonar e redução do uso de medicamentos em adultos com asma (CHOI, KOH, 2002). Na asma grave, foi possível observar a melhoria da função pulmonar, diminuição do uso de medicação, da eosinofilia e da produção de IL-4 no grupo imunizado com a vacina BCG em relação ao que recebeu o placebo (CHOI, KOH, 2002). A proteção contra a asma promovida pela vacinação pelo BCG também foi encontrada na meta-análise de El-Zein, *et al*, 2009.



### **3 HIPÓTESES DO ESTUDO**

A hipótese nula do presente trabalho infere que o PPD e o BCG utilizado como estímulo para células do sangue periférico não apresentam efeito na modificação do perfil de citocinas produzidas por indivíduos atópicos e não atópicos.

A hipótese alternativa é que o PPD e o BCG utilizado como estímulo para células do sangue periférico apresentam efeito na modificação do perfil de citocinas produzidas por indivíduos atópicos e não atópicos.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Identificar os perfis de citocinas induzidos pelo extrato de *Mycobacterium bovis* e pelo PPD em crianças e adolescentes atópicos e não atópicos de Salvador, Bahia.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Estimular células do sangue periférico de dois grupos (indivíduos saudáveis e indivíduos atópicos) com PPD e associar os perfis de citocinas obtidos com atopia;
2. Estimular células do sangue periférico dos indivíduos estudados com extrato de *Mycobacterium bovis* e associar os perfis de citocinas obtidos com atopia.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Caracterização da população de estudo**

Utilizou-se uma amostra de conveniência oriunda do estudo prospectivo conduzido em crianças e adolescentes participantes de um programa sobre fatores de risco para asma e doenças alérgicas do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA, coordenado pelo Prof. Dr. Maurício L. Barreto (programa SCAALA – Social Changes in Asma and Alergies in Latin America). A 3ª. fase do estudo, período no qual os dados do presente trabalho foram coletados, ocorreu quando a população consistia de crianças e adolescentes. Este estudo vem sendo realizado em Salvador, Bahia, cidade cuja população é de aproximadamente, 2.8 milhões de habitantes. A população participante do estudo incluiu, inicialmente, 1.445 crianças, residentes em áreas periféricas do município de Salvador, recrutadas na 1ª infância para um estudo prospectivo sobre infecções intestinais e saneamento entre (1998-2002). (STRINA *et al*, 2003). Em 2004, elas foram contatadas para participar do Programa SCAALA subsidiado pela *Wellcome Trust* (2005-2010). Em 2005 quando as crianças tinham 4-11 anos, foi realizado inquérito epidemiológico para estudar doenças alérgicas, utilizando questionário do ISAAC fase II, traduzido para português e adaptado, além de dados ambientais obtidos com questionários validados. Detalhes deste projeto podem ser visto em (BARRETO *et al*, 2006).

### **5.2 Inquérito epidemiológico de 2013**

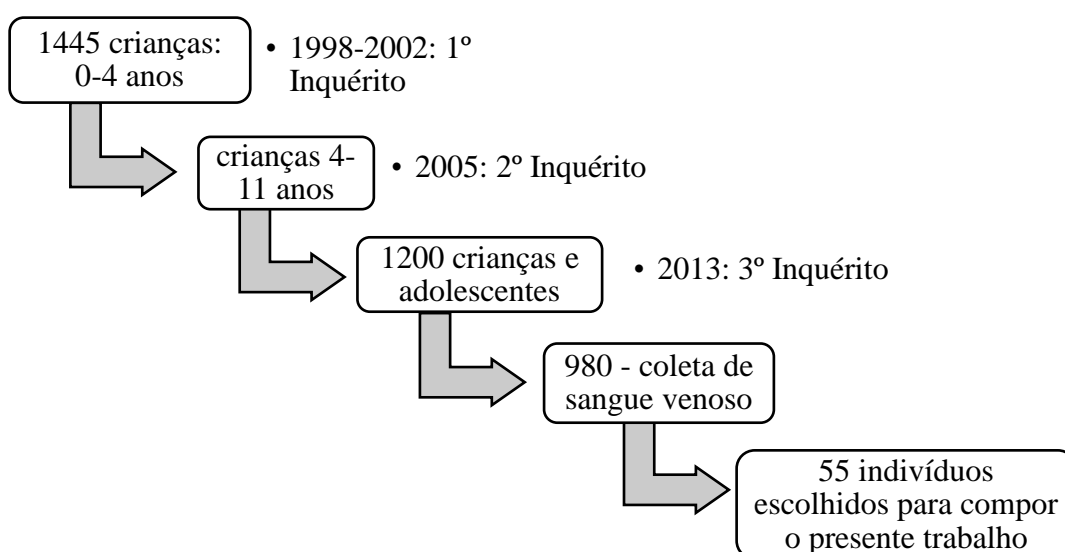
Em 2013 foram reaplicados questionários do ISAAC a 1200 destes indivíduos para determinar a prevalência, incidência e gravidade de asma atual. Destes, 55 adolescentes foram incluídas no presente trabalho. Esta mostra foi uma amostra de conveniência uma vez que por inadimplência da FAPESB a verba aprovada para a dosagem de citocinas de toda a população do estudo não foi liberada. Destes indivíduos 18 eram saudáveis e 29 atópicos.

Este trabalho possui aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA (CEP: 003-05/CEP-ISC) e do Comitê Nacional de Pesquisa (CONEP, resolução número 15.895/2011). O termo de consentimento livre e esclarecido fora apropriadamente obtido do responsável legal de cada criança e adolescentes para o inquérito atual.

### 5.3 Inquérito sorológico

A coleta de sangue venoso foi realizada no período compreendido entre setembro 2013 e janeiro de 2014 em 980 crianças e adolescentes utilizando tubos com EDTA e HEPARINA da linha BD vacuotainer® (Compania Benckton Dickson, Franklin Lakes, USA) para realização de hemograma e cultivo de células respectivamente. Para coleta de soro, foi utilizado tubo seco, após coagulação do sangue os tubos foram centrifugados e os soros coletados foram aliquotados e armazenados em freezer a -20°C em tubos Eppendorf até o momento dos ensaios sorológicos.

Figura 1 - População de estudo



### 5.4 Obtenção do PPD e do extrato de *Mycobacterium bovis*

O PPD foi obtido comercialmente do SSI (Statens Serun Institut, Dinamarca, Copenhagen) na concentração de 1mg/mL para os ensaios *in vitro*.

O extrato do *Mycobacterium bovis* foi obtido a partir do cultivo do microrganismo (cortesia de Dra. Tonya Azevedo Duarte do LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública, FIOCRUZ/BA) no caldo de Middlebrook 7H9 (BD Diagnostic Systems, USA, Sparks) suplementado com 10% de ADC (albumina bovina, dextrose e catalase) (Sigma-Aldrich, USA, St. Louis). As bactérias criopreservadas foram descongeladas e centrifugadas, o meio foi então retirado e as bactérias ressuspensas em 250µL de PBS 1x. A mistura foi homogeneizada no vórtex e distribuída em frascos de cultura contendo o caldo Middlebrook 7H9 suplementado com o ADC e incubadas por 10

dias. Mais dois repiques foram feitos, posteriormente, em intervalos de sete dias para expansão da massa bacteriana.

Para produção do extrato, 46 mL do cultivo foram distribuídos por tubo em um total de 23 tubos de Falcon de 50mL, previamente pesados, e congelados no freezer -20°C. Após descongelamento os tubos foram centrifugados a 2500 g, 4°C durante 15 minutos para separação do meio. Os tubos foram pesados novamente e ressuspensos em PBS 1x. O procedimento de lavagem – centrifugação a 2500 g, 4°C durante 15 minutos e ressuspensão do sedimento em PBS 1x foi repetido três vezes. Após o procedimento, a massa bacteriana obtida foi reunida em um único tubo Falcon de 50mL e ressuspensa em 10mL de PBS 1x e congelada em freezer -20°C. Antes da sonicação as bactérias foram submetidas ao choque térmico sendo mergulhadas cinco vezes em nitrogênio líquido.

A amostra permaneceu em contato com gelo durante o processo de sonicação a qual durou uma hora e consistiu em períodos alternados onde a amostra passava cinco minutos exposta às ondas e cinco minutos em repouso. Uma vez sonicada, a amostra foi centrifugada a 3000 g por 15 minutos para separar as células não lisadas e o sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação a 17000 g sendo o sobrenadante novamente coletado. O inibidor de protease PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil) (Sigma-Aldrich, São Paulo SP, Brasil) foi então adicionado (25µL por 1g de massa) ao sobrenadante e a amostra foi aliqüotada (PARISH, WHEELER, 1998; WOUNDE *et al*, 2013). O controle da lise bacteriana foi feito através da coloração de Ziehl Neelsen e a qualidade do preparado visto por SDS-PAGE (Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida), de acordo com Laemilli (CLEVELAND *et al*, 1977). A concentração final da proteína vista pelo método de Bradford foi de 485,33µg/mL.

### **5.5 Cultivo de células sanguíneas**

Amostras do sangue periférico coletadas em tubo vaicutainer BD heparinizado foram encaminhadas para realização do cultivo de sangue total, em placas de 48 poços, diluídas 1:4 em meio RPMI1640 suplementado com 1% L-glutamina e antibióticos, conforme descrito por Figueiredo e colaboradores (2013). De forma sumária, as amostras foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C, por 24h. Todos os indivíduos tiveram amostras sem estímulo, ou seja, desprovida de antígenos, contendo apenas o meio suplementado para servir de controle negativo e amostras

estimuladas com 5µg do extrato de *Mycobacterium bovis* para avaliação do perfil estimulatório. Deste grupo, 21 indivíduos tiveram, também, poços estimulados com 5µg do PPD (SMITH *et al*, 2010). Os sobrenadantes coletados foram armazenados a -70°C em placas de microtitulação para posterior detecção das citocinas. O perfil de citocinas nos poços estimulados, foi comparado com os poços contendo células não estimuladas.

## 5.6 Quantificação de Citocinas

As citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-13 e IL-17 foram quantificadas no sobrenadante do cultivo celular através do método Multiplex, utilizando os kits Milliplex Map Kit disponíveis comercialmente (Millipore Corporation, Estados Unidos, Billerica, MA) para dosagem de citocinas.

De maneira resumida, o procedimento de dosagem através do multiplex consistiu na adição aos poços de 25 µL da curva das citocinas, dos controles (1 e 2), do branco do kit em duplicata e adicionado, também, em cada um desses poços, 25 µL da matriz, que nesse caso foi o meio no qual foi realizado o cultivo. Logo em seguida, as amostras foram distribuídas bem como as *beads*, as quais detinham os anticorpos anti-citocinas, e foram incubadas por 2 horas na mesa agitadora de placas. Ao término dessa fase, as placas foram lavadas e 25µL do anticorpo de detecção biotilado foi adicionado aos poços e a placa incubada novamente por 1 hora. Passado o período, 25µL de estreptavidina-ficoeritrina foi adicionado e seguido de 30 minutos de incubação. Por fim, foi feita a lavagem da placa com o tampão de lavagem buffer e 150µL do fluido de revestimento foi pipetado nos poços. As amostras foram lidas no MAGPIX (Luminex Corporation, Estados Unidos, Austin, TX)

## 5.7 Dosagem de IgE e definição de atopia

A atopia foi determinada pela presença de IgE sérica específica para aerolérgenos ambientais (sIgE). A concentração de IgE específica foi determinada usando *kits* Immunocap (THERMO/PHADIA, São Paulo, SP, Brasil), para os seguintes alérgenos: *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus*, *Blatella germanica* e *Periplaneta americana*. Os resultados foram expressos em kU/L (1 KU/L correspondendo a 2,4 ng/ml) e foram obtidos através de uma curva padrão produzida através de diluições seriadas de IgE humano contra um soro padrão para IgE da Organização Mundial de

Saúde. Foram considerados atópicos indivíduos que apresentaram resposta de sIgE acima de 0,70 kU/mL para pelo menos um dos alérgenos estudados.

### **5.8 Análise estatística**

O resultado das citocinas foi dicotomizado e os indivíduos com os valores abaixo do limite inferior de detecção do *kit* foram considerados como não respondedores. As concentrações mínimas detectadas foram: 1,1 pg/mL, 1,1 pg/mL, 1,6 pg/mL, 0,7 pg/mL, 1,9 pg/mL, e 1,2 pg/mL para o IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL5, IL-13 e IL-17, respectivamente. O teste exato de Fisher foi utilizado com o nível de significância de 5%. O software Statistical Package for the Social Sciences – SPSS, v. 17.0 foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Para a análise das citocinas onde apenas um dos resultados ficou com frequência igual a 0% (zero por cento), foi atribuído o valor de 0,5% à frequência afim de que se pudesse calcular a significância. Quanto ao TNF $\alpha$  tal artifício não pôde ser utilizado devido a presença de mais de um resultado igual a 0%.

## 6 RESULTADOS

O grupo amostral consistiu de 55 indivíduos, destes, 20 pertenciam ao sexo feminino e 35 ao sexo masculino. A idade dos indivíduos variou de 12 a 21 anos de idade. Com exceção de um, todos apresentaram a cicatriz correspondente à vacinação com BCG. As células do sangue periférico de todos os indivíduos foram estimuladas com o extrato de *Mycobacterium bovis*, e, destes, 21 foram estimulados, também com o PPD. Dezoito indivíduos eram atópicos e 29 não atópicos. A definição de atopia não atinge o número amostral de 55 pois quando a presente análise foi realizada, a dosagem sérica de sIgE ainda não havia sido realizada. Estes dados estão expressos na Tabela 1, presente no anexo A.

A maioria dos indivíduos atópicos (36,2%) apresentaram IgE específica para o ácaro *Blommmia tropicalis*. Este foi seguido pelo *Dermatophagoides pteronissinus* (27,7%), pela *Blatella germânica* (14,8%) e pela *Periplaneta americana* (6,7%). Os dados sobre atopia podem ser verificados na Tabela 2, anexo B. Dentre os atópicos, 4 indivíduos (22,2%) o foram para apenas um alérgeno, 9 (50%) foram para dois alérgenos, 2 (11,1%) foram para três alérgenos e 3 (16,7%) para os quatro alérgeno (dados não mostrados).

Fez-se uso de tabelas de contingência para demonstração dos demais resultados. O Teste Exato de Fisher verificou se as frequências obtidas foram diferentes umas das outras. Sendo assim, inicialmente, verificou-se a produção espontânea das citocinas entre os indivíduos atópicos e não atópicos. Para tal, os poços que não foram estimulados foram utilizados. Não foram observadas alterações significativas nas frequências de respondedores entre atópicos e não atópicos para as diferentes citocinas em células não estimuladas, conforme Tabela 3, anexo C. Ainda assim, é possível observar que a IL-10 apresentou uma alta frequência de indivíduos produtores da citocina tanto entre atópicos quanto entre não atópicos, somando um total de 92,5% indivíduos produtores de IL-10.

A variação do número amostral ao longo das tabelas deve-se ao fato de que, em alguns poços, não foi possível realizar a dosagem para algumas citocinas. Para essas citocinas, não conseguiu-se obter a curva para calibração dessa maneira não foi possível para o programa calcular as concentrações das citocinas.



Tanto o estímulo com o extrato de *Mycobacterium bovis* quanto com o PPD não induziram alterações significativas nas frequências de respondedores para as citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-13 ou IL-17 entre os indivíduos atópicos e não atópicos, como é possível verificar na Tabela 4, anexo D, e na Tabela 5, anexo E, respectivamente.

Apesar de não ser estatisticamente significantes, algumas tendências podem ser observadas quanto à produção de citocinas entre os indivíduos atópicos e não atópicos. Há uma frequência considerável de indivíduos produtores de citocinas Th1; a frequência de respondedores à IL-10 manteve-se sempre mais alta nos não atópicos e a IL-5 deteve maior frequência de não respondedores em ambos grupos nas diferentes condições de estímulo.

Foi construído, também, tabelas de contingência para verificar o efeito dos estímulos na amostra em relação ao controle sem estímulo. Neste caso, para cada citocina, existem quatro resultados possíveis: no primeiro quadrante das frequências à esquerda - indivíduos respondedores sem estímulo que também foram respondedores com o estímulo utilizado (extrato de *Mycobacterium bovis* ou PPD), no segundo quadrante à direita - respondedores sem estímulo que deixaram de sê-lo com o estímulo, no terceiro quadrante à esquerda e abaixo - não respondedores sem estímulo que passam a sê-lo com o estímulo e no quarto e último quadrante - não respondedores sem estímulo que continuam não respondendo mesmo em presença do estímulo.

O estímulo com o extrato de *M. bovis* induziu alterações significativas na produção de IFN $\gamma$ , IL-5, IL-13 e IL-17, como é possível observar na Tabela 6, anexo F. A frequência total dos indivíduos respondedores produtores de IFN $\gamma$  foi de 62,3% (somando-se a frequência dos indivíduos respondedores sem o estímulo que continuaram respondedores com o extrato com a frequência dos indivíduos não respondedores sem o estímulo que tornaram-se respondedores com o extrato).

Ainda em resposta ao extrato de *M. bovis*, a maioria dos indivíduos não responderam com a produção de IL-5 (73,6%) nem de IL-17 (50,9%), em resposta ao extrato. 61,3% dos indivíduos foram respondedores à IL-13. As células de 97,7% dos indivíduos produziram IL-10 em resposta ao extrato de *M. bovis*. Não foi possível fazer essa análise para o TNF $\alpha$  uma vez que a presença de zeros impossibilitou a construção da

tabela 2x2, e o cálculo do teste estatístico. Ainda assim, é notado a ausência de indivíduos, que espontaneamente, não são produtores de TNF $\alpha$ .

O estímulo com o PPD induziu mudança significativa, em relação ao controle sem estímulo, na frequência de respondedores para as citocinas IL-5, IL-13 e IL-17, conforme demonstrado na Tabela 7, anexo F. Na presença do estímulo, a maior parte dos indivíduos não responderam com a produção de IL-5 (70%) nem de IL-17 (61,9%). Para a IL-13, entretanto, 60% dos indivíduos pertenceram ao grupo dos respondedores. Apesar de o IFN $\gamma$  não ter apresentado diferença significativa na sua distribuição em relação ao controle sem estímulo, é possível observar uma maior frequência de indivíduos entre os produtores da citocina em resposta ao PPD (61,9%). Não houve indivíduos não produtores de TNF $\alpha$  sem o estímulo, novamente, não foi possível aplicar o teste estatístico como no estímulo pelo extrato de *M. bovis*.

## 7 DISCUSSÃO

Os ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus* estão entre as três espécies mais comumente associadas à asma e outras alergias (CHEONG, *et al*, 2003; YAP, *et al*, 2014). Em seu trabalho, Yap e colaboradores, 2014, encontraram que a maioria dos indivíduos alérgicos estavam sensibilizados contra *B. tropicalis* seguido pelo *D. pteronyssinus*, enquanto que Baldaçara *et al*, 2013, encontrou maior frequência de indivíduos sensibilizados contra o *Dermatophagoides* seguido pelo *B. tropicalis*. Essa variação pode ser explicada de acordo com a região - enquanto o *B. tropicalis* é comumente encontrado nas regiões tropicais e subtropicais, o *D. pteronyssinus* é característico de regiões temperadas e tropicais (JEEVARATHNUM, *et al*, 2015).

A *B. germânica* e *P. americana* apresentaram as menores frequências de indivíduos sensibilizados. É sabido que a exposição a baratas está ligada com a sensibilização do indivíduo e à presença de sintomas alérgicos no sistema respiratório. Tais espécies correspondem às mais predominantes nas residências (DO, *et al*, 2015).

Não foi verificada neste estudo, alterações significantes nas frequências de respondedores às citocinas, espontaneamente, entre os indivíduos atópicos e não atópicos. O papel das citocinas pode variar de acordo com a patologia alérgica estudada. A produção de citocinas pertencentes ao perfil Th2 (IL-4 e IL-5) aos 12 meses de vida foram relacionadas com o aumento de IgE específica aos 5 anos de idade; além disso, atopia presente em tal idade (5 anos) foi associada, no modelo ajustado, à produção de IL-13 e inibição de IFN $\gamma$  (ROTHERS *et al*, 2011). No estudo de Meyer *et al*, de 2014, não foi encontrada modificações nos níveis séricos de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-13 ou IL-17 entre os grupos de asmáticos classificados de acordo com parâmetros clínicos e fisiológicos. Na revisão sistemática de Sales *et al*, (2012) foram encontrados diferentes padrões de associação de IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10 com atopia, a depender do polimorfismo existente no gene que codifica a citocina estudada.

A dosagem de citocinas dos indivíduos deste estudo, no inquérito anterior, em 2005, utilizando a população total de onde essa amostra foi retirada, mostrou aumento das citocinas características do perfil Th2 (IL-5 e IL-13) nos indivíduos atópicos (com sIgE positiva) em relação aos não atópicos e uma maior produção de IFN $\gamma$  entre os não

atópicos (não atópicos e não asmáticos e asmáticos não atópicos) (FIGUEIREDO *et al*, 2013). Outro trabalho do grupo encontrou associações entre estas citocinas e a atopia quando esta era definida através da reação positiva ao SPT mas não à IgE sérica (ALCÂNTARA-NEVES, *et al*, 2014), como no atual inquérito não foi feito SPT não foi possível observar possíveis associações entre a positividade ao SPT e a frequência de resposta às citocinas.

No inquérito atual, não foi encontrado nenhuma associação entre atopia e os estímulos de células do sangue periférico com extrato de *M. bovis* ou com PPD. Uma possibilidade para explicar este achado foi o tamanho amostral pequeno e sem poder para demonstrar esta associação. Outra possibilidade é que estas associações não ocorram nesta população. Alguns trabalhos também não encontraram relação entre a atopia e esta micobactéria. Yilmaz *et al*, de 2000, não encontrou diferenças entre o tamanho da reação ao teste tuberculínico e atopia, assim como Grüber *et al*, 2001, e Park *et al*, 2015, não encontraram associação entre a vacinação pelo BCG e atopia.

O papel da bactéria e sua associação com atopia não é totalmente compreendido visto que durante a tuberculose, os níveis de sIgE nos indivíduos acometidos pela doença tendem a ser mais altos enquanto que a resolução da patologia, em pacientes com a doença ativa, foi associada à redução dos níveis de sIgE (KUTLU *et al*, 2008; ELLERTSEN *et al*, 2009; LIN *et al*, 2013). O bacilo também pareceu não apresentar efeito na concentração de citocinas já que, com exceção da IL-6 e IL-8, as citocinas mantiveram-se baixas de maneira que os níveis séricos de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17 não foram detectáveis (ELLERTSEN *et al*, 2009).

Apesar disso, é postulado que as micobactérias poderiam reverter a predominância do perfil de resposta Th2, restaurando o equilíbrio Th1/Th2, além de reforçar o *pool* de células Th1 de memória e, uma vez que esse efeito seja prolongado, haveria redução do risco de desenvolvimento de atopia e doenças atópicas (LIN *et al*, 2013; ROOK, *et al*, 2013). A literatura traz trabalhos onde a associação inversa entre a exposição ao bacilo e a atopia foi observada. Ao identificar e medir quantitativamente as comunidades bacterianas presentes na poeira do colchão de crianças com idades entre 6 e 12 anos, Valkonen *et al*, 2015, observou uma relação inversa entre contato com *Mycobacterium* spp e a atopia, além disso, maiores quantidades de *Mycobacterium* spp foram encontradas em indivíduos não asmáticos e não atópicos. A infecção pelo bacilo

foi associada à redução da reatividade ao SPT em crianças alérgicas, em relação às aquelas alérgicas e sem a infecção (OBIHARA *et al*, 2005).

Ao entrar em contato com o hospedeiro, as micobactérias conseguem alterar as suas expressões gênicas (MAGEE *et al*, 2012). Estes organismos apresentam uma série de antígenos que interagem com diferentes fatores do sistema imune do hospedeiro e diferentes micobactérias podem divergir quanto a indução das citocinas, sendo mais ou menos eficientes na sua indução (CHEN *et al*, 2014).

O presente trabalho demonstrou que tanto em resposta ao extrato de *Mycobacterium bovis* quanto em resposta ao PPD, a maioria dos indivíduos foi produtor de IFN $\gamma$ . Tal fato está de acordo com a literatura, uma vez que o IFN $\gamma$  se configura como um marcador da exposição ao microrganismo, sendo liberado logo após o contato com a micobactéria (PAI *et al*, 2014). O IFN $\gamma$  desempenha um importante papel na patologia causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta citocina induz a atividade antimicrobiana de monócitos humanos impedindo o crescimento intracelular da bactéria (BOEHM *et al*, 1997; KLUG-MICU *et al*, 2013); aumenta a expressão de MHC classe II e regula o processamento de antígenos (BOEHM *et al*, 1997). No decorrer da infecção, a maior parte do IFN $\gamma$  tem origem nas células T de memória. As células T *naïves* produzem menores quantidades desta citocina (SZPAKOWSKI *et al*, 2014) e é sabido que, com o passar dos anos, a vacina vai perdendo sua eficiência (ANDERSEN, DOHERTY, 2005); esse fato poderia explicar a indução não muito eficiente de IFN $\gamma$  nos indivíduos que não foram produtores de IFN $\gamma$  em resposta ao estímulo com o PPD e com o extrato. Além disso, mutações no gene do receptor do IFN $\gamma$  podem resultar numa maior susceptibilidade à bactéria com a ausência de controle e disseminação fatal (CUNNINGHAM *et al*, 2000).

Dentre os participantes do estudo não houve nenhum indivíduo que, espontaneamente, não fosse produtor do TNF $\alpha$ . Tal evento pode ser explicado pelo fato de que, apesar do TNF $\alpha$  ser uma citocina com atividade inflamatória e desempenhar papéis em diversas patologias, ela detém funções fisiológicas, desempenhando papéis nos sistemas cardiovascular, pulmonar, imune e neurológico (AGGARWAL *et al*, 2012).

Como não houve indivíduos não produtores de TNF $\alpha$  na ausência de estímulo, não foi possível realizar o cálculo da diferença estatística entre a produção da citocina quando não havia estímulo e em resposta ao extrato de *M. bovis* ou ao PPD. Ainda assim, é

possível observar que a frequência de produtores de TNF $\alpha$  em resposta aos estímulos manteve-se alta, principalmente em resposta ao extrato (83% de indivíduos produtores de TNF $\alpha$ ). Sabe-se que o bacilo pode induzir o aumento desta citocina (HEUTS *et al*, 2013). A produção de TNF $\alpha$  é dada em sinergismo ao IFN $\gamma$ , constituindo assim, um importante sinal para a ativação dos macrófagos (BOEHM *et al*, 1997; LIN *et al*, 2007). Na resposta montada contra as micobactérias, enquanto o IFN $\gamma$  é importante para potencializar a atividade antimicrobiana dos macrófagos o TNF $\alpha$  é crítico para a formação e manutenção do granuloma (SATO *et al*, 1998; LIN *et al*, 2007). Experimentos utilizando o MPT83 recombinante (MPT83r), uma lipoproteína do *M. tuberculosis*, mostraram que esta induz aumento na expressão de TNF $\alpha$ , assim como de IL-6 e IL-12p40, e que a via de produção do TNF $\alpha$  é dependente do TLR-2 (CHEN *et al*, 2012).

As frequências de indivíduos produtores de IL-10 apontam para uma grande quantidade de respondedores à esta citocina e uma indução de produtores de IL-10 em resposta ao extrato de *M. bovis* maior do que em resposta ao PPD. Em estudo anterior realizado pelo grupo, utilizando-se a população total, foi identificado que o aumento da IL-10 estava associado ao número de infecções helmínticas que os indivíduos apresentaram (ALCÂNTARA-NEVES, *et al*, 2014). Em seu trabalho, Piotr Szpakowski e colaboradores encontraram níveis significantes de IL-10 em resposta ao *M. bovis* e ao BCG, mas não em resposta ao PPD mostrando que a bactéria é mais potente que o PPD na indução desta citocina.

A literatura traz evidências de que o *M. bovis* é um bom indutor da IL-10. Em modelos murinos, esta bactéria consegue induzir aumento da população de células T regulatórias Foxp3<sup>+</sup> e dos níveis de IL10 (OVCHINNIKOVA *et al*, 2014). O *M. bovis* também é capaz de induzir células T CD8<sup>+</sup> regulatórias (BOER *et al*, 2013). Ainda em modelo murinho, foi observado que tanto a vacinação quanto a infecção pelo BCG, induzem a produção de IL-10, sendo as células T regulatórias uma importante fonte desta citocina. O aumento de IL-10 foi também relacionado com a diminuição de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-17; a produção de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  de macrófagos de camundongos IL-10<sup>-/-</sup> foi inibida após adição de IL-10 às culturas; de forma semelhante, esplenócitos de camundongos IL-10<sup>-/-</sup> ao serem estimulados com PPD, apresentaram maior produção de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-17 em relação aos animais selvagens (MURRAY, YOUNG, 1999; PITT *et al*, 2012). Macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue

periférico infectados com o *M. tuberculosis* mostraram aumento da produção de IL-10 e TNF $\alpha$  além de apresentarem aumento da expressão de RNA mensageiro de IL-10. Mesmo quando diferentes cargas bacterianas foram utilizadas nas culturas desses macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos, o perfil de citocinas produzidas fora mantido ainda que com diferenças em suas concentrações (GIACOMINI *et al*, 2001).

No trabalho aqui apresentado, nenhum dos estímulos utilizados conseguiu induzir uma alta frequência de respondedores à IL-5, mas induziram uma alta frequência de indivíduos produtores de IL-13. A IL-5 e a IL-13 - citocinas do perfil Th2, atuam juntamente com a IL-4 na indução da reação de hipersensibilidade imediata tipo I. Enquanto a IL-13 induz a hiperresponsividade das vias respiratórias, a estimulação da produção de IgE e a hipersecreção de muco; a IL-5 atua sobre os eosinófilos, desde a estimulação da célula precursora até a sua ativação e proliferação (ROTHENBERG, HOGAN, 2006; TAKATSU *et al*, 2009; UPADHYAYA *et al*, 2011).

O fato dos estímulos não terem induzido uma alta frequência de respondedores à IL-5 no presente estudo, está em concordância com o papel da micobactéria na forte indução de respostas do tipo Th1 o que, como consequência, inibe a expressão da resposta Th2 e, conseqüentemente, não faz dele um bom indutor da IL-5 (DEMISSIE *et al*, 2004; QUIAO *et al*, 2011). Entretanto neste trabalho encontramos o aumento da frequência de respondedores à IL-13. Apesar da forte indução de Th1 por micobactérias, Heuer *et al*, 2013, demonstraram que antígenos de 30-kDa e 38-kDa das micobactérias têm a capacidade de induzir a maturação parcial das células dendríticas e desviar a polarização para um perfil Th2 em modelo murino. Além disto, Van Meijgaarden, 2015 demonstrou que na via de apresentação e antígenos às células T CD8<sup>+</sup> quando ocorre através de HLA-E (uma das moléculas alternativas de apresentação de antígenos), as citocinas do perfil Th2, incluindo-se a IL-13, passam a ser produzidas.

Os estímulos com a micobactéria utilizados no presente trabalho induziu a produção de IL-17 em poucos indivíduos. Em relação ao papel desta citocina, sabe-se que o aumento da produção da IL-17 relaciona-se com patologias inflamatórias, em especial com as doenças autoimunes e a asma, e a sua diminuição deixa o organismo mais susceptível a infecções, principalmente àquelas causadas por fungos e bactérias (PAPPU *et al*, 2011; ROBINSON *et al*, 2013). Foi observado que a atividade da IL-

17 potencializa a ação dos macrófagos murinos aumentando a eliminação da micobactéria (LING *et al*, 2013). Tendo isso em vista, seria esperado o aumento da frequência de respondedores à citocina em resposta aos estímulos. Essa associação não é, entretanto, uniforme (FAN *et al*, 2012). Além disso, a presença, concomitante de um grande número de respondedores à IL-10 (97,7% de produtores de IL-10 em resposta ao extrato), apresentaria efeito inibitório sobre a IL-17, sendo, então natural a presença de poucos indivíduos produtores de IL-17 uma vez que, na ausência de IL-10, há aumento na produção de IFN $\gamma$  e IL-17 (PITT *et al*, 2012).



## 8 CONCLUSÃO

A maioria dos indivíduos atópicos estavam sensibilizados pelos ácaros (*B. tropicalis* e *D. pteronissinus*). Tanto o PPD quanto o extrato de *M. bovis*, induziram alterações nas respostas dos indivíduos às citocinas. As citocinas Th1 assim como a IL-10 apresentaram grande frequência de respondedores, sendo mais bem induzidas do que as citocinas IL-5 e IL-17. A alta frequência de indivíduos produtores de IL-10 foi mantida quando estimulada com o PPD e o extrato de *M. bovis*.

A ausência de resultados significativos relacionados às diferentes frequências (respondedores e não respondedores) observadas na atopia quando não havia estímulo pode ser resultado do pequeno número amostral utilizado. O pequeno número amostral, portanto, configura-se como uma limitação do estudo. A dicotomização da amostra também se configura como fator limitante. Como se trabalhou com frequências, é importante mencionar que a ausência de diferença estatisticamente significativa entre as frequências não implica em uma baixa indução da produção de citocinas.

## **9 PERSPECTIVAS**

Pretendemos aguardar a liberação dos recursos da FABESB para dosar os demais sobrenadantes de 24h estimulados com o extrato e com o PPD, assim como os de 120h que estão armazenados em freezer -70° C. O aumento da amostra e a inserção de mais um período para dosagem das citocinas contribuirá para um melhor entendimento do real comportamento das células do sangue total da população em relação à produção das citocinas e também em relação à condição de atopia e de asma.

## REFERÊNCIA

AABY, P., SHAHEEN, S. O., HEYES, C. B., GOUDIABY, A., HALL, A. J., SHIELL, A. W., JENSEN, H., MARCHANT. Early, BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. **Clinical and Experimental Allergy**. 30, 644-650, 2000

AALBERSE, R. C., AKKERDAAS, J., VAN REE, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. **Allergy**. 56 (6), 478-90, 2001

AGGARWAL, B. B., GUPTA, S. C., KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**. 119 (3), 651-665, 2012

AKKOC, T., OZDEMIR, C., YAZI, D., YESIL, O., BAHCECILER, N. N., BARLAN, I. *Mycobacterium vaccae* immunization to pregnant BALB/c mice ameliorated lung histopathology and bone marrow eosinophilia in ovalbumin sensitized offsprings. **Open Journal of Immunology**. 4 (2), 31-41, 2014

ALCÂNTARA-NEVES, N. M., BADARÓ, S. J., SANTOS, M. C. A., PONTES-DE-CARVALHO, L., BARRETO, M. L. The presence of serum anti-*Ascaris lumbricoides* IgE antibodies and of *Trichuris trichiura* infection are risk factors for wheezing and/or atopy in preschool-aged Brazilian children. **Respiratory Research**. 11 (114), 2010

ALCÂNTARA-NEVES, N. M., BRITTO, G. S. G., VEIGA, R. V., FIGUEIREDO, C. A., FIACCONE, L. R., CONCEIÇÃO, J. S., CRUZ, A. A., RODRIGUES, L. C., COOPER, P. J., PONTES-DE-CARVALHO, L., BARRETO, M. L. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. **BMC Research Notes**. 19 (7), 2014

ALCANTARA-NEVES, N. M., VEIGA, R. V., DATTOLI, V. C. C., FIACCONE, R. L., ESQUIVEL, R., CRUZ, A. A., COOPER, P. J., RODRIGUES, L. C., BARRETO, M. L. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 129 (2), 359-367, 2012

ALGOOD, H. M. S., LIN, P. L., FLYNN, J. L. Tumor Necrosis Factor and Chemokine Interactions in the Formation and Maintenance of Granulomas in Tuberculosis. **Clinical Infectious Disease**. 41, 189-193, 2005

- ALM, J. S., LILJA, G., PERSHAGEN, G., SCHEYNIUS, A. BCG vaccination does not seem to prevent atopy in children with atopic heredity. **Allergy**. 53 (5), 537, 1998
- ANDERSEN, P., DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nature**. 3, 656-662, 2005
- ANNUS, T., MONTGOMERY, S. M., RIIKJÄRV, M-A, BJÖRKSTÉN, B. Atopic disorders among Estonian schoolchildren in relation to tuberculin reactivity and the age at BCG vaccination. **Allergy**. 59, 1068-1073, 2004
- ARNOLDUSSEN, D. L., LINEHAN, M., SHEIKH, A. BCG vaccination and allergy: A systematic review and meta-analysis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 127 (1), 246-253, 2011
- ASHER, A. I., MONTEFORT, S., BJÖRKSTÉN, B., LAI, C. K. W., STRACHAM, D. P., WEILAND, S. K., WILLIAMS, H., ISAAC Phase III study group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **The Lancet**. 368, 733-752, 2006
- BAI, W., LIU, H., JI, Q., ZHOU, Y., LIANG, L., ZHENG, R., CHEN, J., LIU, Z., YANG, H., ZHANG, P., KAUFMANN, S. H. E., GE, B. TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K/AKT signaling pathway. **Cellular Signalling**. 26, 942-950, 2014
- BALDAÇARA, R. P. C., FERNANDES, M. F. M., BALDAÇARA, L., AUN, W. T., MELLO, J. F., PIRES, M. C. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **Revista Paulista de Medicina**. 131 (5), 301-308, 2013
- BARLAN, I., BAHCECILER, N. N., AKDIS, M., AKDIS, C. A. Bacillus Calmette-Guerin, *Mycobacterium bovis*, as an immunomodulator in atopic diseases. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. 26 (2), 365-377, 2006
- BARRETO, M. L., CUNHA, S. S., ALCÂNTARA-NEVES, N. M., CARVALHO, L. P., CRUZ, A. A., STEIN, R. T., GENSER, B., COOPER, P. J., RODRIGUES, L. C. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center

in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). **BMC Pulmonary Medicine**. 6 (15), 2006

BESNARD, A-G., TOGBE, D., COUILLIN, I., TAN, Z., ZHENG, S. G., ERARD, F., BERT, M., QUESNIAUX, V., RYFFEL, B. Inflammasome-IL-1 - Th17 Response in Allergic Lung Inflammation. **Journal of Molecular Cell Biology**. 4 (1), 3-10, 2011

BHAT, R. M., PRAKASH, C. Leprosy: An Overview of Pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 1-6, 2012

BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., HOWARD, J. C. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annual Review of Immunology**. 15, 749-795, 1997

BOER, M. C., MEIJGAARDE, K. E. V., BASTID, J., OTTENHOFF, T. H. M., JOOSTEN, S. A. CD39 is involved in mediating suppression by *Mycobacterium bovis* BCG-activated human CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> regulatory T cells. **European Journal of Immunology**. 43, 1925-1932, 2013

BURTON, O. T., OETTGEN, H. C. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. **Immunological Reviews**. 242(1), 128-143, 2011

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**. 15 (1), 29-35, 2006

CAVALLO, G. P., ELIA, M., GIORDANO, D., BALDI, C., CAMMAROTA, R. Decrease of specific and total IgE levels in allergic patients after BCG vaccination. **American Medical Association**. 128, 1058-1060, 2002

CAVE, A. J. E. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient egypt. **British Journal of Tuberculosis**. 33 (3), 142-152, 1939

CHEN, S-T, LI, J-Y, ZHANG, Y., GAO, X., CAI, H. Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. **The Journal of Immunology**. 188, 668-677, 2012

CHEN, Y. Y., CHANG, J-R, HUANG, W-F, HSU, S-C, KUO, S-C, SUN, J-R, DOU, H-Y. The pattern of cytokine production *in vitro* induced by ancient and modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strain. **Plos One**. 9 (4), 2014

- CHEONG, N., SOON, S. C., RAMOS, J. D. A., KUO, I. C., KOLORTKAR, P. R., LEE, B. W., CHUA, K. Y. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blot 1 and Derp 1. **Allergy**. 58 (9), 912-920, 2003
- CHIDA, Y., HAMER, M., STEPTOE, A. A bidirectional relationship between psychosocial factors and atopic disorders: A systematic review and meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**. 70, 102-106, 2008
- CHOI, I. S., KOH, Y. I. Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: a randomized, controlled trial. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. 88, 584-591, 2002
- CLEVELAND, D. W., FISCHER, S. G., KIRSCHNER, M. W., LAEMMLI, U. K. Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis\*. **The Journal of Biological Chemistry**. 252 (3), 1102-1106, 1977
- COCA, A. F., COOKE, R. A. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. **The Journal of Immunology**. 8 (3), 163-182, 1923
- COËFFIER, M., LORENTZ, A., MANNNS, M. P., BISCHOFF, S. C. Epsilon germ-line and IL-4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy. **Allergy**. 60 (6), 822-827, 2005
- COFFMAN, R. L., OHARA, J., BOND, M. W., CARTY, J., ZLOTNIK, A., PAUL, W. E. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. **The Journal of Immunology**. 136 (12), 4538-4541, 1986
- COLLINS, C. H., GRANGE, J. M., YATES, M. D. Mycobacteria in water. **Journal of Applied Bacteriology**. 57 (2), 193-211, 1984
- CORRY, D. B., KHERADMAND, F. Induction and regulation of the IgE response. **Nature**. 402, 18-23, 1999
- COSMA, C. L., SHERMAN, D. R., RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic Mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**. 57, 641-676, 2003
- COVERT, T., RODGERS, M. R., REYES, A. L., STELMA, G. N. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**. 65 (6), 2492-2496, 1999

- CUNHA, S. S., CRUZ, A. A., DOURADO, I., BARRETO, M. L., FERREIRA, L. D. A., RODRIGUES, L. C. Lower prevalence of reported asthma in adolescents with symptoms of rhinitis that received neonatal BCG. **Allergy**. 59, 857-862, 2004
- CUNNINGHAM, J. A., KELLNER, J. D., BRIDGE, P. J., TREVENEN, C. L., MCLEOD, D. R., DAVIES, H. D. Disseminated bacille Calmette-Guérin infection in an infant with a novel deletion in the interferon-gamma receptor gene. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. 4 (8), 791-794, 2000
- DAMASCENO, E., COSTA-CARVALHO, B. T., SOLÉ, D., WANDLSEN, G. F. Custos diretos e indiretos da asma: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. 35 (6), 234-240, 2012
- DANTEC, C. L., DUGUET, J-P, MONTIEL, A., DUMOUTIER, N., DUBROU, S., VINCENT, V. Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. **Applied and Environmental Microbiology**. 68 (11), 5318-5325, 2002
- DECKERS, I. A. G., McLEAN, S., LINSSEN, S., MOMMERS, M., VAN SCHAYCK, C. P., SHEIKH, A. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990–2010: a systematic review of epidemiological studies. **Plos One**. 7 (7), 2012
- DEMISSIE, A., ABEBE, M., ASEFFA, A., ROOK, G., FLETCHER, H., ZUMLA, A., WELDINGH, K., BROCK, I., ANDERSEN, P., DOHERTY, T. M., VACSEL Study Group. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4 $\delta$ 2. **The Journal of Immunology**. 172, 6938-6943, 2004
- DHEDA, K., SCHWANDER, S. K., ZHU, B., ZYL-SMIT, R. N. V., ZHANG, Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. **Respirology**. 15, 433-450, 2010
- DO, D. C., ZHAO, Y., GAO, P. Cockroach allergen exposure and risk of asthma. **Allergy**. 2015
- ELLERTSEN, L. K., STORLA, D. G., DIEP, L. M., BROKSTAD, K. A., WIKER, H. G., HETLAND, G. Allergic sensitisation in tuberculosis patients at the time of diagnosis and following chemotherapy. **BMC Infectious Diseases**. 2009

EL-ZEIN, M., PARENT, M-E, BENEDITTI, A., ROUSSEAU, M-C. Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**. 39 (2), 469-486, 2010

ERNST, P., CORMIER, Y. Relative Scarcity of Asthma and Atopy among Rural Adolescents Raised on a Farm. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 161, 1563-1566, 2000

FALKINHAM, J. O. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. 9 (2), 177-215, 1996

FALKINHAM, J. O. Mycobacterial Aerosols and Respiratory Disease. **Emerging Infectious Diseases**. 9 (7), 763-767, 2003

FAN, L., XIAO, H-P, DU, Z-Y, ERNS, J. D. Variation of Mycobacterium tuberculosis antigen- specific IFN- $\gamma$  and IL-17 responses in healthy Tuberculin Skin Test (TST)-positive human subjects. **Plos One**. 7 (8), 2012

FIGUEIREDO, C. A., ALCANTARA-NEVES, N. M., AMORIN, L., SILVA, N. B., CARBALHO, L. P., COOPER, P. J., RODRIGUES, L. C., BARRETO, M. L. Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: The role of the environment. **Clinical Immunology**. 139, 57-64, 2011

FIGUEIREDO, C. A., AMORIM, L. D., ALCANTARA-NEVES, N. M., MATOS, S. M., COOPER, P. J., RODRIGUES, L. C., BARRETO, M. L. Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 131 (4), 1064-1068, 2013

FIGUEIREDO, C. A., BARRETO, M. L., RODRIGUES, L. C., COOPER, P. J., SILVA, N. B., AMORIM, L. D., ALCANTARA-NEVES, N. M. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. **Infection and Immunity**. 78 (7), 3160-3167, 2010

FINKELMAN, F. D., ATONA, I. M. K., URBAN, J. F., HOLMES, J., OHARA, J., TUNG, A. S., SAMPLE, J. Vg., PAUL, W. E. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. **The Journal of Immunology**. 141, 2335-2341, 1988



- FISHER-LIGHTER, J. PENG, C-H. Infection with Mycobacterium tuberculosis is inversely associated with childhood asthma. **Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology**. 25(2), 80-85, 2012
- FULKERSON, P. C., ROTHENBERG, M. E. Targeting Eosinophils in Allergy, Inflammation and Beyond. **Nature Reviews**. 12 (2), 117-129, 2013
- FYHRQUIST, N., ROUKOLAINEN, L., SUOMALAINEN, A., LEHTIMÄKI, S., VECKMAN, V., VENDELIN, J., KARISOLA, P., LEHTO, M., SAVINKO, T., JARVA, H., KOSUNEN, T. U., CORANDER, J., AUVINEN, P., PAULIN, L., HERTZEN, L., LAATIKAINEN, T., MÄKELÄ, M., HAAHTELA, T., GRECO, D., HANSKI, I., ALENIUS, H. *Acinetobacter* species in the skin microbiota protect against allergic sensitization and inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 134 (6), 1301-1309, 2014
- GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. 36, 850-859, 2012
- GAGNEUX, S., DERIEMER, K., VAN, T., KATO-MAED, M., JONG, B. C., NARAYANAN, S., NICOL, M., NIEMANN, S., KREMER, K., GUITIERREZ, M. C., HILTY, M., HOPEWELL, P. C., SMALL, P. M. Variable host–pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. **PNAS**. 103 (8), 2869-2873, 2006
- GALLI, S. J., NAKAE, S., TSAI, M. Mast cells in the development of adaptative immune responses. **Nature Immunology**. 6 (2), 135-142, 2005
- GALLI, S. J., TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**. 18 (5) 693-704, 2012
- GALLI, S. J., TSAI, M., PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**. 454, 445-454, 2008
- GARCIA-MARCOS, L., SUÁREZ-VARELA, M., CANFLANCA, I. M., GARRIDO, J. B., QUIRÓS, A. B., LÓPEZ-SILVARREY, V. A., HENÁNDEZ, G. G., GUILLÉN-GRIMA, F., DÍAZ, C. G., GONZÁLEZ, I. H., PENA, A. A., MONGE, R. B. BCG Immunization at Birth and Atopic Diseases in a Homogeneous Population of Spanish Schoolchildren. **International Archives of Allergy and Immunology**. 137, 303-309, 2005

- GEHA, R. S., JABARA, H. H., BRODEUR, S. R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. **Nature**. 3, 721-731, 2003
- GEHRING, A. J., DOBOS, K. M., BELISLE, J. T., HARDING, C. V., BOOM, W. H. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): A Novel TLR-2 Ligand That Inhibits Human Macrophage Class II MHC Antigen Processing. **The Journal of Immunology**. 273, 1660-2668, 2004
- GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**.36 (3), 514-532, 2012
- GIACOMINI, E., IONA, E., FERRONI, L., MIETTINEN, M., FATTORINI, L., OREFICI, G., JULKUNEN, I., COCCIA, E. M. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **Journal of Immunology**. 166 (12), 7033-7041, 2001
- GIBSON, S. DNA of Jesus-era shrouded man in Jerusalem reveals earliest case of leprosy. **Science Daily**. Disponível em <<http://www.sciencedaily.com/releases/2009/12/091216103558.htm>> Acesso em jan 2015
- GITTLER, J. K., SHEMER, A., SUÁRES-FARIÑAS, M., FUENTES-DUCULAN, J., GULEWICZ, K. J., WANG, C. Q. F., MITSUI, H., CARDINALE, I., STRONG, C. G., KRUEGER, J. G., GUTTMAN-YASSKY, E. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 130 (6), 1344-1354, 2012
- GOULART, I. M. B., PENNA, G. O., CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 35 (4), 365-375, 2002
- GOULD, H. J., SUTTON, B. J., BEAVIL, A. J., BEAVIL, R. L., MCCLOSKEY, N., COKER, H. A., FEAR, D., SMURTHWAITE, L. The biology of IgE and the basis of allergic disease. **Annual Review of Immunology**. 21, 579-628, 2003
- GOUVEIA, A. C. C., BRUGIOLO, A. S. S., ALVES, C. C. S., SILVA, F. M. C., MESQUITA, F. P., GAMEIRO, J., FERREIRA, A. P. Th2 responses in OVA-

sensitized BALB/c mice are down-modulated by mycobacterium bovis BCG treatment. **Journal of Clinical Immunology**. 33, 235-245, 2013

GRÜBER, C., KULIG, M., BERGMANN, R., GUGGENMOOS-HOLZMANN, I., WAHN, U., MAS-90 Study Group. Delayed hypersensitivity to tuberculin, total immunoglobulin e, specific sensitization, and atopic manifestation in longitudinally followed early bacille calmette-guérin-vaccinated and non-vaccinated children. **Pediatrics**. 107 (3), 2001

GUITIERREZ, M. C., BRISSE, S., BROSCHE, R., FABRE, M., OMAI, B., MARMIESSE, M., SUPPLY, P., VINCENT, V. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **Plos Pathogens**. 1 (1), 55-61, 2005

HANSKI, I., HERTZEN, L. V., FYHRQUIST, N., KOSKINEN, K., TORPPA, K., LAATIKAINEN, T., KARISOLA, P., AUVINEN, P., PAULIN, L., MÄKELÄ, M. J., VATIAINEN, E., KOSUNEN, T. U., ALENIUS, H., HAAHTELA, T. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. **PNAS**. 109 (21), 8334-8339, 2012

HERSHBERG, R., LIPATOV, M., SMALL, P. M., SHEFFER, H., NIEMANN, S., HOMOLKA, S., ROACH, J. C., KREMER, K., PETROV, D. A., FELDMAN, M. W., GAGNEUX, S. High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography. **Plos Biology**. 6 (12), 2658-2671, 2008

HERZMANN, C., ERNST, M., EHLERS, S., STENGER, S., MAERTZDORF, J., SOTGIU, G., LANGE, C. Increased frequencies of pulmonar regulatory T-cells in latente Mycobacterium tuberculosis infection. **European Respiratory Journal**. 40 (6), 1450-1457, 2012

HEUER, M., BEHLICH, A-S., LEE, J-S., RIECHINI, E., JO, E-K., LUTZ, M. B. The 30-kDa and 38-kDa antigens from Mycobacterium tuberculosis induce partial maturation of human dendritic cells shifting CD4+ T cell responses towards IL-4 production. **BMC Immunology**. 14 (48), 2013

HEUTS, F., GAVIER-WIDÉN, D., CAROW, B., JOAREZ, J., WIGZELL, H., ROTTENBERG, M. E. CD4+ cell-dependent granuloma formation in humanized mice infected with mycobacteria. **PNAS**, 110 (16), 6482-6487, 2013

HVIID, A., MELBYE, M. Measles-Mumps-Rubella vaccination and asthma-like disease in early childhood. **American Journal of Epidemiology**. 168 (11), 1277-1283, 2008

ISHIZAKA, K. Cellular events in the IgE antibody response. **Academi Press**. 1976

JEEVARATHNUM, A. C., NIEKERK, A., GREEN, R. J., BECKER, P., MASEKELA, R. Prevalence of *Blomia tropicalis* allergy in two regions of South Africa. **SAMJ**. 105 (7), 567-569, 2015

KAUFMANN, S. H. E. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 61, 54-58, 2002

KAUFMANN, S. H. E., COLE, S. T., MIZRAHI, V., RUBIN, E., NATHAN, C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. **JEM**. 201 (11), 1693-1697, 2005

KIM, Y-J, KIM, H-J, KANG, M-J, YU, H-S, SEO, J-H, KIM, H-Y, PARK, S-J, LEE, Y-C, HONG, S-J. Bacillus Calmette-Guérin Suppresses Asthmatic Responses via CD4+CD25+ Regulatory T Cells and Dendritic Cells. **Allergy, Asthma & Immunology Research**. 6 (3), 201-207, 2014

KLUG-MICU, G. M., STENGER, S., SOMMER, A., LIU, P. T., KRUTZIK, S. R., MODLIN, R. L., FABRI, M. CD40 ligand and interferon- $\gamma$  induce an antimicrobial response against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes. **Immunology**. 139 (1), 121-128, 2013

KOH, Y. I., CHOI, I. S., PARK, S-C, KANG, K-W. BCG infection during pre-sensitization or even post-sensitization inhibits airway sensitivity in na animal modelo f allergic asthma. **Korean Medical Science**. 15, 265-272, 2000

KRAUSE, T. G., HVIID, A., KOCH, A., FRIBORG, J., HJULER, T., WOHLFAHRT, J., OLSEN, O. R., KRISTENSEN, B., MELBYE, M. BCG vaccination and risk of atopy. **JAMA**. 289 (8), 1012-1015, 2003

KUTLU, A., BOZKANAT, E., ÇIFTÇI, F., BOZKURT, B., GORUR, R., ARDIÇ, N., TASKAPAN, O. Effect of active tuberculosis on skin prick allergy tests and serum IgE levels. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**. 18 (2), 113-118, 2008

- LAGRANDERIE, M., ABOLHASSANI, M., VANOIRBEEK, J., LEFORT, J., NAHORI, M-A, SILVA, J-R S., HUERRE, M., VARGAFTIG, B., MARCHAL, G. Mycobacterium bovis BCG killed by extended freeze-drying reduces airway hyperresponsiveness in 2 animal models. **Allergy and Clinical Immunology**. 121 (2), 471-478, 2008
- LARCHÉ, M. Regulatory T cells in allergy and asthma. **Chest Journal**. 132 (3), 1007-1014, 2007
- LARSON, D., HÜBNER, M. P, TORRERO, M. N., MORRIS, C. P., BRANKIN, A., SWIERCZEWSKI, B. E., DAVIES, S. J., VONAKIS, B. M., MITRE, E. Chronic Helminth Infection Reduces Basophil Responsiveness in an IL-10–Dependent Manner. **The Journal of Immunology**. 188(9), 4188-4199, 2012
- LIAO, M-F, LIAO, M-N, LIN, S-N, CHEN, J-Y, HUANG, J-J. Prevalence of Allergic Diseases of Schoolchildren in Central Taiwan. **Journal of Asthma**. Estados Unidos. 45, 541-545, 2009
- LIN, C. T. S., KRISHNAN, G., MANUEL, A. A. The impact of pulmonary tuberculosis treatment on the prevalence of allergic rhinitis. **Ear, Nose & Throat Journal**. 92 (8), 358-399, 2013.
- LIN, P. L., PLESSNER, H. L., VOITENOK, N. N., FLYNN, J. L. Tumor Necrosis Factor and Tuberculosis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. 12, 22-25, 2007
- LING, W. L., WANG, L. J., POND, J. C. H., LAU, A. S. Y., LI, J. C. B. A role for interleukin-17A in modulating intracellular survival of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin in murine macrophages. **Immunology**. 140, 323-334, 2013
- LUTWAMA, F., KAGINA, B. M., WAJJA, A., WAISWA, F., MANSOOR, N., KIRIMUNDA, S., HUGHES, E. J., KIWANUKA, N., JOLOBA, M. L., MOSOKE, P., SCRIBA, T. J., MAYANJA-KIZZA, H., DAY, C. L., HANEKOM, W. A. Distinct T-cell responses when BCG vaccination is delayed from birth to 6 weeks of age in ugandan infants. **Journal of Infectious Disease**. 209, 887-897, 2014
- MAGEE. D. A., TARAKTSOGLU, M., KILLICK, K. E., NALPAS, N. C., BROWNE, J. A., PARK, S. D. E., CONLON, K. M., LYNN, D. J., HOKAMP, K., GORDON, S. V., GORMLEY, E., MACHUGH, D. E. Global gene expression and

systems biology analysis of bovine monocyte-derived macrophages in response to *in vitro* challenge with *Mycobacterium bovis*. **Plos One**. 7(2), 2012

MAIZELS, R. M., McSORLEY, H. J., SMYTH, D. J. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? **Clinical & Experimental Immunology**. 177, 38-46, 2014

MARCH, M. E., SLEIMAN, P. M. A., HAKONARSON, H. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. **International Journal of General Medicine**. (6), 253-265, 2013

MARSH, D. G., HSU, S. H., HUSSAINS, R., MEYERS, D. A., FREIDHOFF, L. R., BIAS, W. B. Genetics of human immune response to allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 65 (5), 322-332, 1980

MARTIGNON, G., ORYSZCZYN, M-P., ANNESI-MAESANO, I. Does childhood immunization against infectious diseases protect from the development of atopic disease? **Pediatric Allergy and Immunology**. 16, 193-200, 2005

MARTIN, H., TAUBE, C. Regulatory T cells and regulation of allergic airway disease. **American Journal of Clinical Experimental Immunology**.1 (2), 166-178, 2012

McSORLEY, H. J., MAIZELS, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**. 25 (4), 585-608, 2012

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**.4 (10), 762-774, 2004

MELO, R. C., LIU, L., XENAKIS, J. J., SPENCER, L. A. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unravelling novel mechanisms of selective secretion. **Allergy**. 68 (3), 274-284, 2013

MENDONÇA, V. A., MELO, G. E. B. A., TEIXEIRA, A. L., COSTA, R. D., ANTUNES, C. M. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. 83 (4), 343-350, 2008

MEYER, N., NUSS, S. J., ROTHE, T., SIEBENHÜNER, A., AKDIS, C. A., MENZ, GÜNTER. Differential serum protein markers and the clinical severity of asthma. **Journal of Asthma and Allergy**. 7, 67-75, 2014

Ministério da Saúde. Tuberculose. Disponível em <[http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11045&Itemid=674](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674)> Acesso em mar 2015

MINTY, A., CHALON, P., DEROCQ, J. M., DUMONT, X., GUILLEMOT, J.C, KAGHAD, M., LABIT, C., LEPLATOIS, P., LIAUZUN, P., MILOUX, B., MINTY, C., CASELLAS, P., LOISON, G., LUPKER, J., SHIRE, D., FERRARA, P., CAPUT, D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**. 362, 248-250, 1993

MORENO-AMOR, A. L., SANTOS, L. N., GALVÃO, A. A., BELITARDO, E. M. M. A., SILVA, E. S., ALCÂNTARA-NEVES, N. M., PONTES-DE-CARVALHO, L. Candidin and trichophytin stimulate the production of Th1 and regulatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells: implication for their use as adjuvants in immunotherapy. **Immunotherapy**. 6 (12), 1255-1264, 2014

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista Médica de Minas Gerais**. 21 (1), 42-48, 2011

MUNN, D. H., SHARMA, M. D., HOU, D., BABAN, B., LEE, J. R., ANTONIA, S. J., MESSINA, J. L., CHANDLER, P., KONI, P. A. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **Journal of Clinical Investigation**. 114 (2), 280-290, 2004

MURRAY, P. J., YOUNG, R. A. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. **Infection and Immunity**. 67 (6), 3087-3095, 1999

NUHOGLU, Y., NUHOGLU, C., OZCAY, S. The association between delayed type hypersensitivity. **Allergologia et Immunopathologia**. 31(1), 14-7, 2003

OBIHARA, C. C., BEYERS, N., GIE, R. P., POTTER, P. C., MARAIS, B. J., LOMBARD, C. J., ENARSON, D. A., KIMPEN, J. L. L. Inverse association between Mycobacterium tuberculosis infection and atopic rhinitis in children. **Allergy**. 60, 1121-1125, 2005

OGAWA, Y., GRANT, J. A. Mediators of Anaphylaxis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. 27, 249-260, 2007

- OLESEN, A. B., JUUL, S., THESTRUP-PEDERSEN, K. Atopic dermatitis is increased following vaccination for measles, mumps and rubella or measles infection. **Acta Dermato-Venereologica**. 83, 445-450, 2003
- ORME, I. M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. **Tuberculosis**. 94 (1), 8-14, 2014
- OVCHINNIKOVA, O. A., BERGE, N., KANG, C., URIEN, C., KETELHUTH, D. F., POTTIER, J., DROUET, L., HANSSON, G. K., MARCHAL, G., BÄCK, M., SCHWARTZ-CORNIL, I., LAGRANDERIE, M. Mycobacterium bovis BCG killed by extended freeze-drying induces an immunoregulatory profile and protects against atherosclerosis. **Journal of Internal Medicine**. 275 (1), 49-58, 2014
- PABST, O., MOWAT, A. M. Oral Tolerance to Food Protein. **Nature**. 5 (3), 232-239, 2012
- PACÍFICO, L. G. G., MARINHO, F. A. V., FONSECA, C. T., BARSANTE, M. M., PINHO, V., SALES-JUNIOR, P. A., CARDOSO, L. S., ARAÚJO, M. I., CARVALHO, E. M., CASSALI, G. D., TEIXEIRA, M. M., OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T Cells Independent of Interleukin-10. **Infection and Immunity**. 77(1), 98-107, 2009
- PAI, M., DENKINGER, C. M., KIK, S. V., RANGAKA, M. X., ZWERLING, A., OXLADE, O., METCALFE, J. Z., CATTAMANCHI, A., DOWDY, D. W., DHEDA, K., BANAEI, N. Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**. 27 (1), 3-20, 2014
- PAPADOPOULOS, N. G., *et al.* Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. **Clinical and Translational Allergy**. 2 (21), 2012
- PAPPU, R., RAMIREZ-CARROZZI, V., SAMBANDAM, A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. **Immunology**. 134, 8-16, 2011
- PARISH, T., WHEELER, P. R. Preparation of cell-free extracts from Mycobacteria. **Methods in Molecular Biology**. 101, 77-89, 1998



PARK, S. S., HEO, E. Y., KIM, D. K., CHUNG, H. S., LEE, C-H. The association of BCG vaccination with atopy and asthma in adults. **International Journal of Medical Sciences**. 12 (8), 668-673, 2015

PARKER, W., OLLERTON, J. Evolutionary biology and anthropology suggest biome reconstitution as a necessary approach toward dealing with immune disorders. **Evolution, Medicine, & Public Health**. 89-103, 2013

PAUNIO, M. HEINONEN, O. P., VIRTANEN, M., LENIKKI, P., PATJA, A., PELTOLA, H. Measles history and atopic diseases: A population-based cross-sectional study. **JAMA**. 283 (3), 343-6, 2000

PEAVY, R. D., METCALFE, D. D. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. **Allergy and Clinical Immunology**. 8 (4), 310-315, 2008

PEPYS, J. Atopy. **Clinical Aspects of Immunology**. 877, 1975

PITT, J. M., STAVROPOULOS, E., REDFORD, P. S., BEEBE, A. M., BANCROFT, G. J., YOUNG, D. B., O'GARRA, A. Blockade of IL-10 signaling during BCG vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Immunology**. 189 (8), 4079-4087, 2012

QUIAO, D., YANG, B. Y., LI, L., MA, J. J., ZHANG, X. L., LAO, S. H., WU, C. Y. ESAT-6- and CFP-10-specific Th1, Th22 and Th17 cells in tuberculous pleurisy may contribute to the local immune response against *Mycobacterium Tuberculosis* infection. **Clinical Immunology**. 73, 330-337, 2011

RAJAN, T. V. The gel-coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. **Trends in Immunology**. 24(7), 376-379, 2003

RASOGI, N., LEGRAND, E., SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Revue Scientifique et Technique**. 20 (1), 21-54, 2001

REECE, J., SIRACUSA, M. C., SOUTHARD, T. L., BRAYTON, C. F., URBAN, J. F., SCOTT, A. Hookworm-Induced Persistent Changes to the Immunological Environment of the Lung. **Infection and Immunity**. 76 (8), 3511-3524, 2008

RING, J. Atopy: condition, disease, or syndrome? **Springer**. 3-9, 1991

- ROBINSON, K. M., MANNI, M. L., BISWAS, P. S., ALCORN, J. F. Clinical consequences of targeting IL-17 and TH17 in autoimmune and allergic disorders. **Current Allergy and Asthma Report**. 13 (6), 587-595, 2013
- RODRIGUES, L. C., NEWCOMBE, P. J., CUNHA, S. S., ALCANTARA-NEVES, N. M., GENSER, B., CRUZ, A. A., SIMOES, S. M., FIACCONE, R., AMORIM, L., COOPER, P. J., BARRETO, M. L. Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clinical and Experimental Allergy**. 38, 1769-1777, 2008
- ROOK, G. A. W., BRUNET, L. R. Microbes, immunoregulation, and the gut. **Gut**. 54, 317-320, 2005
- ROOK, G. A. W., LOWRY, C. A., RAISON, C. L. Microbial “old friends”, immunoregulation and stress resilience. **Evolution, Medicine, and Public Health**. 46-64, 2013
- ROTHENBERG, M. E., HOGAN, S. P. The Eosinophil. **Annual Reviews of Immunology**. 24, 147-174, 2006
- ROTHERS, J., HALONEN, M., STERN, D. A., LOHMAN, C., MOBLEY, S., SPANGENBERG, D., ANDERSON, D., WRIGHT, A. Adaptive cytokine production in early life differentially predicts total IgE and asthma through age 5. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 128 (2), 397-402, 2011
- SALES, I. R. F., FERNANDES, E. S., PEIXOTO, D. M., MUNIZ, M. T. C., SARINHOS, E. S. C., SOUZA, V. M. O. Associação dos polimorfismos nos genes da IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 e a asma infantil: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. 35 (3), 89-97, 2012
- SAMARY, C. S., ANTUNES, M. A., SILVA, J. D., SILVA, A. L., ARAÚJO, C. C., BAKKER-ABREU, I., DIAZ, B. L., FERNEZLIAN, S., PARRA, E. R., CAPELOZZI, V. L., SILVA, P. L., SILVA, L. J. R., ROCCO, P. R. Impact of Bacillus Calmette-Guérin Moreau vaccine on lung remodeling in experimental asthma. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. 189 (3), 614-623, 2013

SAMTEN, B., WANG, X., BARNES, P. F. Immune regulatory activities of early antigenic target of 6-kD protein of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis vaccine design. **Tuberculosis**. 91, 114-118, 2011

SATO, K., AKAKI, T., TOMIOKA, H. Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). **Clinical Experimental Immunology**. 112 (1), 63-68, 1998

SCHIFFER, C., LALANNE, A. I., CASSARD, L., MANCARDI, D. A., MALBEC, O., BRUHNS, P., DIF, F., DAËRON, M. A Strain of *Lactobacillus casei* inhibits the Effector Phase of Immune Inflammation. **The Journal of Immunology**. 187, 2646, 2655, 2011

SCHNOELLER, C., RAUSCH, S., PILLAI, S., AVAGYAN, A., WITTING, B. M., LODDENKEMPER, C., HAMANN, A., HAMELMANN, E., LUCIUS, R., HARTMANN, S. A Helminth Immunomodulator Reduces Allergic and Inflammatory Responses by Induction of IL-10-Producing Macrophages. **The Journal of Immunology**. 180, 4265-4272, 2008

SCOLLARD, D.M. Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. **Microbes and Infection**. 2, 1835-1843, 2000

SHIRAKAWA, T., ENOMOTO, T., SHIMAZU, S-I, HOPKIN, J. M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. **Science**. 275, 77-79, 1997

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical Microbiology**. 16 (3), 463-496, 2003

SMITH, J. J., LOVEREN, H. V., HOEKSTRA, M. O., KANT, P. A. A. V., FOLKERTS, G., NIJKAMP, F. P. Therapeutic treatment with heat-killed *Mycobacterium vaccae* (SRL172) in a mild and severe mouse model for allergic asthma. **European Journal of Pharmacology**. 470, 193-199, 2003

SMITH, S. G., LALOR, M. K., GORAK-STOLINSKA, P., BLITZ, R., BEVERIDGE, N. E. R., WORTH, A., McSHANE, H., DOCKRELL, H. M. *Mycobacterium tuberculosis* PPD-induced immune biomarkers measurable *in vitro* following BCG

vaccination of UK adolescents by multiplex bead array and intracellular cytokine staining. **BMC Immunology**. 11, 1-11, 2010

SOLÉ, D., CAMELO-NUNES, I. C., WANDALSEN, G. F., MALLOZI, M. C. A asma na criança e no adolescente brasileiro: contribuição do International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo, 32(1), 114-125, 2013

SOLÉ, D., MELO, K. C., CAMELO-NUNES, I. C., FREITAS, L. S., BRITTO, M., ROSÁRIO, N. A., JONES, M., FISCHER, G. B., NASPITZ, C. K. Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among brazilian schoolchildren (13–14 years old): comparison between isaac phases one and three. **Journal of Tropical Pediatrics**. 53(1), 13-21, 2006

SOROOSH, P., DOHERTY, T. A. Th9 and Allergic Disease. **Immunology**. 127 (4), 450-458, 2009

STRACHAN, D. P. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. **Thorax**. 55, S2-S10, 2000

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**. 299, 1259-1260, 1989

STRANNEGARD, O., STRANNEGARD, I-L. The causes of the increasing prevalence of allergy: is atopy a microbial deprivation disorder? **Allergy**. Reino Unido, 56, 91-102, 2001

STRINA, A., CAIRNCROSS, S., BARRETO, M. L., LARREA, C., PRADO, M. S. Childhood diarrhoea and observed hygiene behavior in Salvador, Brazil. **American Journal of Epidemiology**. 157 (11), 1032-1038, 2003

SZPAKOWSKI, P., BIET, F., LOCHT, C., PASZKIEWICZ, M., RUDNICKA, W., DRUSZCZYNSKA, M., ALLAIN, F., FOL, M., PESTEL, J., KOWALEWICZ-KULBAT, M. Dendritic cell activity driven by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing human IL-18, in healthy BCG vaccinated adults. **Journal of Immunology Research**. 2014

TAKATSU, K., KOURO, T., NAGAI, Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. **Elsevier**. 191-236, 2009

TAKHAR, P., CORRIGAN, C. J., SMURTHWAITE, L., O'CONNOR, B. J., DURHAM, S. R., LEE, T. H., GOULD, H. J. Class switch recombination to IgE in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic patients with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 119 (1), 213-218, 2007

THOREL, M. F., FALKINHAM, J. O., MOREAU, R. G. Environmental Mycobacteria from alpine and subalpine habitats. **FEMS Microbiology Ecology**. 49 (3), 343-347, 2004

TSUJIMURA, Y., INADA, H., YONEDA, M., FUJITA, T., MATSUO, K., YASUTOMI, Y. Effects of mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. **Plos One**. 9 (9), 2014

TURNER, D., JACKSON, J. A., FAULKNER, H., BEHNKE, J., ELSE, K. J., KAMGNO, J., BOUSSINESQ, M., BRADLEY, J. E. Intensity of Intestinal Infection with Multiple Worm Species Is Related to Regulatory Cytokine Output and Immune Hyporesponsiveness. **The Journal of Infectious Disease**. 197, 1204-1212, 2008

UMETSU, D. T., DEKRUYFF, R. H. IL-17-Producing NKT Cells in Airway Inflammation. Th17 Cells in Healthy and Disease. **Springer**. 497-512. 2011

UPADHYAYA, B., YIN, Y., HILL, B. J., DOUEK, D. C., PRUSSIN, C. Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells. **The Journal of Immunology**. 187, 3111-3120, 2011

VALKONEN, M., WOUTERS, I. M., TÄUBEL, M., RINTALA, H., LENTERS, V., VASARA, R., GENUNEIT, J., BRAUN-FAHRLÄNDER, C., PIARROUX, R., MUTIUS, E., HEEDERIK, D., HYVÄRINEN, A. Bacteria exposures and associations with atopy and asthma children. **PLoS One**. 10 (6), 1-14, 2015

VAN MEIJGAARDEN, K. E., HAKS, M. C., CACCAMO, N., DIELI, F., OTTENHOFF, M., JOOSTEN, S. A. Human CD8+ T-cells Recognizing Peptides from Mycobacterium tuberculosis (Mtb) Presented by HLA-E Have an Unorthodox Th2-like, Multifunctional, Mtb Inhibitory Phenotype and Represent a Novel Human Tcell Subset. **PLOS**. 1-24, 2015

VON HERTZEN, L., HANSKI, I., HAAHTELA, T. Biodiversity loss and inflammatory diseases are two global megatrends that might be related. **EMBO**. 12 (11), 1089-1093, 2011

VON MUTIUS, E. Infection: friend or foe to the development of asthma? The epidemiological evidence. **European Respiratory Journal**. 18, 872-881, 2001

WAO. IgE in clinical allergy and allergy diagnosis. Disponível em <[http://www.worldallergy.org/professional/allergic\\_diseases\\_center/ige/](http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/ige/)> Acesso fev 2015

WAO/EAACI. WAO/EAACI Allergy Definitions. Disponível em <[http://www.worldallergy.org/professional/allergic\\_diseases\\_center/nomenclature/english.php](http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/nomenclature/english.php)> Acesso jan 2015

WEINER, J., PARIDA, S. K., MAERTZDORF, J., BLACK, G. F., REPSILBER, D., TELAAR, A., MOHNEY, R. P. Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients. **PLoS One**. 7 (7), 2012

WINGENDER, G., ROGERS, P., BATZER, G., LEE, M. S., BAI, D., PEI, B., KHURANA, A., KRONENBERG, M., HORNER, A. A. Invariant NKT Cells are Required for Airway Inflammation Induced by Environmental Antigens. **Journal of Experimental Medicine**. 208 (6), 1151-1162, 2011

WOUNDE, A. D. V., MAHENDRAN, K. R., UMMELS, R., PIERSMA, S. R., PHAM, T. V., JIMÉNEZ, C. R., PUNDER, K., WEL, N. N. V., WINTERHALTER, M., LUIRINK, J., BITTER, W., HOUBEN, E. N. G. Differential detergent extraction of *Mycobacterium marinum* cell envelope proteins identifies an extensively modified threonine-rich outer membrane protein with channel activity. **Journal of Bacteriology**. 195 (9), 2050-2059, 2013

YAP, J. M. G., CHING, M. W., CABANILLA, C. Q., RAMOS, J. D. A., SANTOS, K. C. Multiple house dust mite allergen-sensitization profiles in children with allergic asthma. **Journal of Allergy and Therapy**. 5 (3), 2014

YILMAZ, M., BINGÖL, G., ALTINTAS, D., KENDIRLI, S. G. Correlation between atopic diseases and tuberculin responses. **Allergy**. 55, 664-667, 2000

## ANEXO

ANEXO A - Tabela 1: Caracterização da população do estudo

**Tabela 1: Caracterização da população do estudo**

<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>
	<b>20 (36,4%)</b>	<b>35 (63,6%)</b>
<b>Cicatriz vacinal</b>	Presença	Ausência
	<b>50 (98,1%)</b>	<b>1 (1,9%)</b>
<b>Atopia</b>	Presença	Ausência
	<b>18 (38,3%)</b>	<b>29 (61,7%)</b>

ANEXO B – Tabela 2: Dados de atopia

**Tabela 2: Dados de atopia**

	<b>Valor mínimo sIgE (kU/L)</b>	<b>Valor máximo sIgE (kU/L)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Frequência de atópicos - n (%)</b>
<i>Blomia tropicalis</i>	0,10	100,00	5,49	16,80	17 (36,2)
<i>Dermatophagoides pteronissinus</i>	0,10	100,00	7,71	21,00	13 (27,7)
<i>Blatella germanica</i>	0,10	2,60	0,27	0,49	7 (14,8)
<i>Periplaneta americana</i>	0,10	2,71	0,40	0,66	3 (6,7)



ANEXO C – Tabela 3: Citocinas produzidas espontaneamente por células do sangue total nos indivíduos atópicos e não atópicos

Tabela 3: Citocinas produzidas espontaneamente por células do sangue total nos indivíduos atópicos e não atópicos

Citocinas	Atopia	Produção de Citocinas		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 46</b>			
	Atópico	9 (19,6)	9 (19,6)	0,550
	Não Atópico	17 (37,0)	11 (23,9)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 46</b>			
	Atópico	18 (39,1)	--	**
	Não Atópico	28 (60,9)	--	
IL-10	<b>Total: 40</b>			
	Atópico	14 (35,0)	3 (7,5)	0.069
	Não Atópico	23 (57,5)	0 (0,5)	
IL-5	<b>Total:46</b>			
	Atópico	3 (6,5)	15 (32,6)	1,000
	Não Atópico	6 (13,0)	22 (47,8)	
IL-13	<b>Total: 40</b>			
	Atópico	7 (17,5)	10 (25,0)	0,755
	Não Atópico	11 (27,5)	12 (30,0)	
IL-17	<b>Total: 46</b>			
	Atópico	4 (8,7)	14 (30,4)	0,739
	Não Atópico	8 (17,4)	20 (43,5)	

\*Teste Exato de Fisher; \*\*valor de p não calculado.

ANEXO D - Tabela 4: Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com extrato de *Mycobacterium bovis* em indivíduos atópicos e não atópicos

Tabela 4: Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com extrato de *Mycobacterium bovis* em indivíduos atópicos e não atópicos

Citocina	Atopia	Produção de Citocinas		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 45</b>			
	Atópico	13 (28,9)	5 (11,1)	0,527
	Não Atópico	16 (35,6)	11 (24,4)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 45</b>			
	Atópico	16 (35,6)	2 (4,4)	0,648
	Não Atópico	22 (48,9)	5 (11,1)	
IL-10	<b>Total: 38</b>			
	Atópico	16 (42,1)	1 (2,6)	0,447
	Não Atópico	21 (55,3)	0 (0,5)	
IL-5	<b>Total: 45</b>			
	Atópico	4 (8,9)	14 (31,1)	0,735
	Não Atópico	8 (17,8)	19 (42,2)	
IL-13	<b>Total: 39</b>			
	Atópico	10 (25,6)	7 (17,9)	0,738
	Não Atópico	15 (38,5)	7 (17,9)	
IL-17	<b>Total: 45</b>			
	Atópico	7 (15,6)	11 (24,4)	0,543
	Não Atópico	14 (31,1)	13 (28,9)	

\*Teste exato de Fisher; \*\*valor de p não calculado.

ANEXO E – Tabela 5: Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com PPD em indivíduos atópicos e não atópicos

Tabela 5: Produção de citocinas por células do sangue total em resposta ao estímulo com PPD em indivíduos atópicos e não atópicos

Citocina	Atopia	Produção de Citocinas		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 20</b>			
	Atópico	5 (25,0)	4 (20,0)	1,000
	Não Atópico	7 (35,0)	4 (20,0)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 20</b>			
	Atópico	4 (20,0)	5 (25,0)	0,160
	Não Atópico	9 (45,0)	2 (10,0)	
IL-10	<b>Total: 19</b>			
	Atópico	3 (15,8)	6 (31,6)	1,000
	Não Atópico	6 (31,6)	4 (21,1)	
IL-5	<b>Total: 19</b>			
	Atópico	3 (15,8)	6 (31,6)	1,000
	Não Atópico	3 (15,8)	7 (36,8)	
IL-13	<b>Total: 19</b>			
	Atópico	6 (31,6)	3 (15,8)	1,000
	Não Atópico	6 (31,6)	4 (21,1)	
IL-17	<b>Total: 20</b>			
	Atópico	3 (15,0)	6 (30,0)	0,670
	Não Atópico	5 (25,0)	6 (30,0)	

\*Teste exato de Fisher; \*\* valor de p não calculado.

ANEXO F – Tabela 6: Citocinas produzidas por células do sangue total de 55 indivíduos estimuladas ou não pelo extrato de *Mycobacterium bovis*

Tabela 6: Citocinas produzidas por células do sangue total de 55 indivíduos estimuladas ou não pelo extrato de *Mycobacterium bovis*

Citocina	Resposta das células não estimuladas	Respostas das células estimuladas com extrato de <i>M. bovis</i>		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 53</b>			
	Respondedor	22 (41,5)	7 (13,2)	<b>0,045</b>
	Não Respondedor	11 (20,8)	13 (24,5)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 53</b>			
	Respondedor	44 (83,0)	9 (17,0)	<b>**</b>
	Não Respondedor	--	--	
IL-10	<b>Total: 43</b>			
	Respondedor	38 (88,4)	0 (0,5)	0,116
	Não Respondedor	4 (9,3)	1 (2,3)	
IL-5	<b>Total: 52</b>			
	Respondedor	11 (20,8)	0 (0,5)	<b>0,001</b>
	Não Respondedor	3 (5,7)	39 (73,6)	
IL-13	<b>Total: 54</b>			
	Respondedor	17 (38,6)	2 (4,5)	<b>0,001</b>
	Não Respondedor	10 (22,7)	15 (34,1)	
IL-17	<b>Total: 54</b>			
	Respondedor	17 (32,1)	0 (0,5)	<b>0,001</b>
	Não Respondedor	9 (17,0)	27 (50,9)	

\*Teste exato de Fisher; \*\*valor de p não calculado; valores em negrito são estatisticamente significantes.

ANEXO G – Tabela 7: Citocinas produzidas por células do sangue total de 21 indivíduos estimuladas ou não pelo PPD

Tabela 7: Citocinas produzidas por células do sangue total de 21 indivíduos estimuladas ou não pelo PPD

Citocina	Resposta das células não estimuladas	Resposta ao estímulo do PPD		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 21</b>			
	Respondedor	6 (28,6)	5 (23,8)	0,659
	Não Respondedor	7 (33,3)	3 (14,3)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 21</b>			
	Respondedor	14 (66,7)	7 (33,3)	**
	Não Respondedor	--	--	
IL-10	<b>Total: 20</b>			
	Respondedor	9 (45,0)	10 (50,0)	0,500
	Não Respondedor	1 (5,0)	0 (0,5)	
IL-5	<b>Total: 20</b>			
	Respondedor	4 (20,0)	0 (0,5)	<b>0,003</b>
	Não Respondedor	2 (10,0)	14 (70,0)	
IL-13	<b>Total: 20</b>			
	Respondedor	9 (45,0)	1 (5,0)	<b>0,020</b>
	Não Respondedor	3 (15,0)	7 (35,0)	
IL-17	<b>Total: 21</b>			
	Respondedor	5 (23,8)	1 (4,8)	<b>0,014</b>
	Não Respondedor	3 (14,3)	12 (57,1)	

\*Teste exato de Fisher; \*\*valor de p não calculado; valores em negrito são estatisticamente significantes.

ANEXO H: Manuscrito do artigo

## **PERFIL DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO PPD E PELO EXTRATO DE *Mycobacterium bovis* EM ADOLESCENTES ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DE SALVADOR, BAHIA**

Flávia de Araújo Sena<sup>a</sup>

Emília Maria Medeiros de Andrade Belitardo<sup>a</sup>

Alana Alcântara Galvão<sup>a</sup>

Gustavo Nunes de Oliveira Costa<sup>b</sup>

Renato Corrêa Viana Casarin<sup>c</sup>

Tonya Azevedo Duarte<sup>c</sup>

Rosemeire Leovigildo Fiaccone<sup>d</sup>

Maurício Lima Barreto<sup>b</sup>

Neuza Maria Alcântara Neves<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>b</sup> Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>d</sup> Instituto de Matemática, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>e</sup> Departamento de Periodontite, Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil

### **Resumo**

**Introdução:** Têm-se debatido o papel de microrganismos na imunomodulação de doenças alérgicas atópicas cuja prevalência tem aumentado. A Micobactéria emerge, então, como um potencial agente imunomodulador. **Objetivo:** Identificar os perfis de citocinas induzidos pelo extrato de *Mycobacterium bovis* e pelo PPD e como elas são induzidas em adolescentes atópicos e não atópicos de Salvador, Bahia. **Metodologia:** O estudo utilizou amostra de conveniência de 55 indivíduos cujo sangue periférico coletado fora utilizado no cultivo de sangue total. As células foram estimuladas com 5µg do extrato de *M. bovis* ou 5µg do PPD. Utilizou-se o Multiplex para verificar o perfil de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , IL-13, IL-5 e IL-17) induzido em 24h. A atopia foi determinada através da presença de IgE acima de 0,7 kU/mL para pelo menos um alérgeno (*Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus*, *Blatella germanica* e *Periplameta americana*). A amostra foi dicotomizada em respondedor e não respondedor com base no limite mínimo de detecção do kit para cada citocina e o teste Exato de Fisher foi aplicado. **Resultados:** O estímulo com PPD e com extrato induziu mudanças significativas nas frequências de respondedores à IL-5, IL-13 e IL-17, e à IL-5, IL-13, IL-17 e IFN $\gamma$ , respectivamente. 97,7% dos indivíduos foram produtores de IL-10 em resposta ao extrato. Os compostos não induziram alterações significativas nas frequências de respondedores entre os grupos de atopia. **Considerações Finais:** As dosagens de citocinas serão finalizadas, incluindo-se a do sobrenadante de 120h, permitindo a aplicação de teste estatístico com maior poder para verificação dos efeitos dos compostos utilizados.

**Palavras-chave:** Alergia. Atopia. Imunomodulação. PPD. *Mycobacterium bovis*.

## 1 Introdução

A prevalência de doenças alérgicas tem aumentado em todo o mundo (PAPADOPOULOS, *et al*, 2012). Em determinadas regiões da América Latina chega a ser tão alta quanto aquelas encontradas em regiões desenvolvidas (ASHER, *et al*. 2006; SOLÉ, *et al*, 2013). No Brasil, apesar das tendências de prevalência das doenças alérgicas não serem homogêneas, a prevalência de asma (46,9%) é uma das maiores da América Latina (SOLÉ, *et al*, 2006).

Os tratamentos disponíveis para as doenças atópicas, como os corticosteróides, possuem efeitos colaterais, tornando-os preocupantes, principalmente nos indivíduos que necessitam de altas doses e uso por tempo prolongado (SMIT, *et al*, 2003). Strachan (1989) postulou a hipótese da higiene, a qual induziu uma mudança de pensamento na comunidade científica – os agentes etiológicos de infecções crônicas que vão desde vírus a helmintos passaram a ser vistos como prováveis educadores do sistema imune do hospedeiro e seu contato na infância protegeria aqueles com predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas (STRACHAN, 2000; ROOK, *et al*, 2013). Algumas vacinas, como a tríplice bacteriana e a BCG (Bacilo Calmette-Guérin), emergiram como agentes potenciais no combate às alergias (MARTIGNON, *et al*, 2005).

O papel da vacinação pela BCG, e da infecção assintomática por *Mycobacterium* spp na proteção contra o desenvolvimento das doenças atópicas tem sido debatido. Estudos epidemiológicos sobre o tema divergem bastante quanto aos achados; alguns encontram ação protetora (AABY, *et al*, 2000; CAVALLO, *et al*, 2002) enquanto outros não a acham (GRÜBER, *et al*, 2001; ANNUS, *et al*, 2004). Há, portanto, uma grande variedade de estudos que visam elucidar o papel efetivo que as micobactérias têm na imunomodulação das alergias, e até o momento seus resultados são controversos. O presente trabalho buscou, através do estímulo das células do sangue periférico de indivíduos atópicos e não atópicos com componentes da micobactéria, entender como as células imunes do hospedeiro respondem ao estímulo e se essa resposta difere entre os indivíduos atópicos e não atópicos.

## 2 Metodologia

### 2.1 Caracterização da população de estudo

Utilizou-se uma amostra de conveniência constituída por 55 adolescentes, oriunda do estudo prospectivo conduzido em crianças e adolescentes, o SCAALA (Social Changes in Asma and Alergies in Latin America) - programa sobre fatores de risco para asma e doenças alérgicas do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA. Os questionários do ISAAC foram replicados a 1200 crianças e adolescentes participantes. O trabalho possui aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Saúde Coletiva da UFBA e do Comitê Nacional de Pesquisa. O termo de consentimento livre e esclarecido fora apropriadamente obtido do responsável legal de cada participante para o inquérito atual.

Dos 55 indivíduos, 20 pertenciam ao sexo feminino e 35 ao sexo masculino. A idade variou de 12 a 21 anos. Com exceção de um, todos apresentaram a cicatriz correspondente à vacinação com BCG. As células do sangue periférico de todos os indivíduos foram estimuladas com o extrato de *Mycobacterium bovis*, e, destes, 21 foram estimulados, também com o PPD. Dezoito indivíduos eram atópicos e 29 não atópicos. A definição de atopia não atinge o número amostral de 55 pois quando a presente análise foi realizada, a dosagem sérica de IgE específica ainda não havia sido realizada.

## 2.2 Dosagem de IgE e definição de atopia

A atopia foi determinada pela presença de IgE sérica específica para aerolérgenos ambientais (sIgE). A concentração de sIgE foi determinada usando kits Immunocap (THERMO/PHADIA, São Paulo, SP, Brasil), para *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus*, *Blatella germanica* e *Periplaneta americana*. Foram considerados atópicos indivíduos que apresentaram resposta de sIgE acima de 0,70 kU/mL para pelo menos um dos alérgenos estudados.

## 2.3 Cultivo de células sanguíneas

Para o cultivo do sangue total, foi feita a diluição 1:4 em meio RPMI1640 suplementado com 1% L-glutamina e antibióticos do sangue coletado em tubos com Heparina (Compania Benckton Dickson, Franklin Lakes, USA), conforme descrito por Figueiredo e colaboradores (2013). Todos os indivíduos tiveram amostras sem estímulo, ou seja, desprovida de antígenos, contendo apenas o meio suplementado para servir de controle negativo e amostras estimuladas com 5µg do extrato de



*Mycobacterium bovis* para avaliação do perfil estimulatório. Deste grupo, 21 indivíduos tiveram, também, poços estimulados com 5µg do PPD (SMITH *et al*, 2010). O perfil de citocinas nos poços estimulados, foi comparado com os poços contendo células não estimuladas.

#### 2.4 Obtenção do PPD e do extrato de *Mycobacterium bovis*

O PPD foi obtido comercialmente (Statens Serum Institut, Dinamarca, Copenhagen) para os ensaios *in vitro* e o extrato do *Mycobacterium bovis* foi obtido a partir do cultivo do microrganismo no caldo de Middlebrook 7H9 (BD Diagnostic Systems, USA, Sparks) suplementado com 10% de ADC (albumina bovina, dextrose e catalase) (Sigma-Aldrich, USA, St. Louis). O cultivo foi centrifugado a 2500 g, 4°C durante 15 minutos para separação do meio e, após lavagem - centrifugação a 2500 g, 4°C durante 15 minutos e ressuspensão do sedimento em salina tamponada de fosfato (PBS) - as bactérias foram submetidas ao choque térmico em nitrogênio líquido e depois sonicadas durante uma hora. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 3000 g por 15 minutos para separar as células não lisadas e a 17000 g, sendo o sobrenadante novamente coletado. O inibidor de protease PMSF (Sigma-Aldrich, São Paulo SP, Brasil) foi adicionado (25µL por 1g de massa) ao sobrenadante (PARISH, WHEELER, 1998; WOUNDE *et al*, 2013). A concentração final da proteína vista pelo método de Bradford.

#### 2.5 Quantificação de Citocinas

As citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-13 e IL-17 foram quantificadas no sobrenadante do cultivo celular através do Multiplex, utilizando os kits Milliplex Map Kit (Millipore Corporation, Estados Unidos, Billerica, MA) para dosagem de citocinas.

#### 2.6 Análise estatística

O resultado das citocinas foi dicotomizado e os valores abaixo do limite inferior de detecção do *kit* foram considerados como não respondedores. As concentrações mínimas detectadas foram: 1,1 pg/mL, 1,1 pg/mL, 1,6 pg/mL, 0,7 pg/mL, 1,9 pg/mL, e 1,2 pg/mL para o IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL5, IL-13 e IL-17, respectivamente. O teste exato de Fisher foi utilizado com o nível de significância de 5%. O software Statistical Package for the Social Sciences – SPSS, v. 17.0 foi utilizado para realizar as análises

estatísticas. Para a análise das citocinas onde apenas um dos resultados ficou com frequência igual a 0% (zero por cento), foi atribuído o valor de 0,5% à frequência afim de que se pudesse calcular a significância. Quanto ao TNF $\alpha$  tal artifício não pôde ser utilizado devido a presença de mais de um resultado igual a 0%.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Atopia

A maioria dos indivíduos atópicos (36,2%) apresentaram sIgE para *Blomia tropicalis*. Este foi seguido pelo *Dermatophagoides pteronissinus* (27,7%), *Blatella germânica* (14,8%) e *Periplaneta americana* (6,7%). Dentre os atópicos, 4 indivíduos (22,2%) o foram para apenas um alérgeno, 9 (50%) foram para dois alérgenos, 2 (11,1%) para três alérgenos e 3 (16,7%) para os quatro alérgeno (dados não mostrados). Os ácaros *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* estão entre as espécies mais comumente associadas com alergias (CHEONG, *et al*, 2003; YAP, *et al*, 2014). Em seu trabalho, Yap e colaboradores, 2014, encontraram que a maioria dos indivíduos alérgicos estavam sensibilizados contra *B. tropicalis* seguido pelo *D. pteronyssinus*. A exposição às baratas *B. germânica* e *P. americana* está ligada com a sensibilização do indivíduo e à presença de sintomas alérgicos no sistema respiratório. Tais espécies correspondem às mais predominantes nas residências (DO, *et al*, 2015).

#### 3.2 Produção de citocinas nos grupos de atopia

A produção espontânea das citocinas entre os indivíduos atópicos e não atópicos foi verificada utilizando os poços sem estímulo. Nenhuma alteração significativa nas frequências de respondedores entre atópicos e não atópicos para as citocinas dosadas foi observada. No inquérito anterior realizado pelo grupo em 2005 utilizando a população total de onde essa amostra foi retirada, observou-se o aumento da IL-5 e IL-13 nos indivíduos atópicos em relação aos não atópicos e uma maior produção de IFN $\gamma$  entre os não atópicos (FIGUEIREDO *et al*, 2013). Em outro trabalho do grupo as associações entre as citocinas e atopia ocorreu quando esta era definida através da reação positiva ao SPT mas não à IgE sérica (ALCÂNTARA-NEVES, *et al*, 2014).

A resposta ao estímulo com o extrato de *M. bovis* e com o PPD também não induziram alterações significativas nas frequências de respondedores para nenhuma das citocinas estudadas entre os indivíduos atópicos e não atópicos. Alguns trabalhos não

encontraram relação entre a atopia e Micobactéria (GRÜBER, *et al*, 2001; PARK, *et al*, 2015). Ellertsen e colaboradores (2009) não observaram efeito do bacilo na concentração de citocinas já que, com exceção da IL-6 e IL-8, as demais (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17) mantiveram-se baixas. Ainda assim, é postulado que as micobactérias poderiam reverter a predominância do perfil de resposta Th2, restaurando o equilíbrio Th1/Th2, além de reforçar o *pool* de células Th1 de memória havendo a redução do risco de desenvolvimento de atopia e doenças atópicas (ROOK, *et al*, 2013). A literatura traz trabalhos onde a associação inversa entre a exposição ao bacilo e a atopia foi observada (OBIHARA *et al*, 2005; VALKONEN, *et al*, 2015).

### 3.3 Citocinas induzidas pelo extrato de *M. bovis* e pelo PPD

Fez-se uso de tabelas de contingência para verificar o efeito dos estímulos em relação ao controle sem estímulo. Para cada citocina, existem quatro resultados possíveis: no primeiro quadrante das frequências à esquerda - indivíduos respondedores sem estímulo que também foram respondedores com o estímulo utilizado (extrato de *M. bovis* ou PPD), no segundo quadrante à direita - respondedores sem estímulo que deixaram de sê-lo com o estímulo, no terceiro quadrante à esquerda e abaixo - não respondedores sem estímulo que passam a sê-lo com o estímulo e no quarto e último quadrante - não respondedores sem estímulo que continuam não respondendo mesmo em presença do estímulo. O Teste Exato de Fisher verificou se as frequências obtidas foram diferentes umas das outras. Ocorreu variação do número amostral ao longo das tabelas pois, em alguns poços, não foi possível realizar a dosagem para algumas citocinas uma vez que a curva para calibração não foi obtida impossibilitando o programa de calcular as concentrações das citocinas.

O estímulo com o extrato de *M. bovis* induziu alterações significativas na produção de IFN $\gamma$ , IL-5, IL-13 e IL-17, como é possível observar na Tabela 1. A frequência total dos indivíduos respondedores produtores de IFN $\gamma$  foi de 62,3% (somando-se a frequência do primeiro e terceiro quadrantes). A maioria dos indivíduos não respondeu ao extrato com a produção de IL-5 (73,6%) nem de IL-17 (50,9%). 61,3% dos indivíduos foram respondedores à IL-13. As células de 97,7% dos indivíduos produziram IL-10 em resposta ao extrato de *M. bovis*. Não foi possível fazer essa análise para o TNF $\alpha$  uma vez que a presença de zeros impossibilitou a construção da tabela 2x2 e o cálculo do teste estatístico.

O estímulo com o PPD induziu mudança significativa, em relação ao controle sem estímulo, na frequência de respondedores para as citocinas IL-5, IL-13 e IL-17, conforme demonstrado na Tabela 2. Na presença do estímulo, a maior parte dos indivíduos não responderam com a produção de IL-5 (70%) nem de IL-17 (61,9%). Para a IL-13, 60% dos indivíduos pertenceram ao grupo dos respondedores. Apesar do IFN $\gamma$  não apresentar diferença significativa na sua distribuição em relação ao controle sem estímulo, é possível observar uma maior frequência de indivíduos entre os produtores da citocina em resposta ao PPD (61,9%). Não foi possível aplicar o teste estatístico para o TNF $\alpha$  pelo mesmo motivo do ocorrido com o extrato de *M. bovis*.

A maioria dos indivíduos, no presente trabalho, produziu IFN $\gamma$ . A citocina é um marcador da exposição à micobactéria, sendo liberada logo após o seu contato (PAI *et al*, 2014). O IFN $\gamma$  induz a atividade antimicrobiana de monócitos humanos impedindo o crescimento intracelular da bactéria (BOEHM *et al*, 1997; KLUG-MICU *et al*, 2013); aumenta a expressão de MHC classe II e regula o processamento de antígenos (BOEHM *et al*, 1997). No decorrer da infecção, a maior parte do IFN $\gamma$  tem origem nas células T de memória (SZPAKOWSKI *et al*, 2014), e é sabido que a vacina vai perdendo sua eficiência com o passar dos anos (ANDERSEN, DOHERTY, 2005). Tal fato poderia explicar a presença de indivíduos não produtores de IFN $\gamma$  em resposta aos estímulos.

O pequeno número amostral e o fato do TNF $\alpha$  deter funções fisiológicas desempenhando papéis nos sistemas cardiovascular, pulmonar, imune e neurológico (AGGARWAL *et al*, 2012), podem explicar a ausência de indivíduos que, espontaneamente, não foram produtores da citocina. Mesmo não sendo possível calcular a diferença estatística entre a produção do TNF $\alpha$  quando não havia estímulo e em resposta aos estímulos, a frequência de produtores de TNF $\alpha$  manteve-se alta, principalmente em resposta ao extrato (83% de indivíduos produtores de TNF $\alpha$ ). O bacilo pode induzir o aumento da citocina (HEUTS *et al*, 2013) cuja produção é dada em sinergismo ao IFN $\gamma$ , constituindo um sinal para ativação dos macrófagos (BOEHM *et al*, 1997; LIN *et al*, 2007). Na resposta montada contra as micobactérias, o TNF $\alpha$  é crítico para a formação e manutenção do granuloma (LIN *et al*, 2007). Foi observado que o MPT83 recombinante - uma lipoproteína do *M. tuberculosis*, é capaz de induzir aumento na expressão de TNF $\alpha$  (CHEN *et al*, 2012).

Houve uma grande quantidade de indivíduos respondedores produtores de IL-10 sendo maior em resposta ao extrato de *M. bovis* do que em resposta ao PPD. No estudo anterior do grupo, foi identificado que o aumento da IL-10 estava associado ao número de infecções helmínticas que os indivíduos apresentaram (ALCÂNTARA-NEVES, *et al*, 2014). Em seu trabalho, Szpakowski e colaboradores encontraram níveis significantes de IL-10 em resposta ao *M. bovis* e ao BCG, mas não em resposta ao PPD mostrando que a bactéria é mais potente que o PPD na indução da IL-10. Macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue periférico infectados com o *M. tuberculosis* mostraram aumento da produção de IL-10 e TNF $\alpha$  além de apresentarem aumento da expressão de RNA mensageiro de IL-10 (GIACOMINI *et al*, 2001). Em modelos murinos, esta bactéria consegue induzir aumento da população de células T regulatórias Foxp3<sup>+</sup>, dos níveis de IL10 (OVCHINNIKOVA *et al*, 2014) e induzir células T CD8<sup>+</sup> regulatórias (BOER *et al*, 2013).

Nenhum dos estímulos utilizados induziu uma alta frequência de respondedores à IL-5, mas uma alta frequência de indivíduos produtores de IL-13 foi observada. A IL-5 e a IL-13 - citocinas do perfil Th2, atuam juntamente com a IL-4 na indução da reação de hipersensibilidade imediata tipo I (UPADHYAYA *et al*, 2011). A baixa indução de IL-5 em resposta aos estímulos está de acordo com o papel da micobactéria - o bacilo é um forte indutor de respostas do tipo Th1 o que inibe a expressão da Th2 e não o torna um bom indutor da IL-5 (DEMISSIE *et al*, 2004; QUIAO *et al*, 2011). Apesar disso neste trabalho encontramos o aumento da frequência de respondedores à IL-13. Em contrapartida à forte indução de Th1 por micobactérias, Heuer *et al*, 2013, demonstraram que antígenos de 30-kDa e 38-kDa das micobactérias têm a capacidade de desviar a polarização para um perfil Th2 em modelo murino. Van Meijgaarden, 2015 demonstrou que na via de apresentação de antígenos às células T CD8<sup>+</sup> quando ocorre através de HLA-E (uma das moléculas alternativas de apresentação de antígenos), as citocinas do perfil Th2, incluindo-se a IL-13, passam a ser produzidas.

Os estímulos com a micobactéria utilizados induziu a produção de IL-17 em poucos indivíduos. Sabe-se que o aumento da IL-17 relaciona-se com patologias inflamatórias e que a sua diminuição deixa o organismo mais susceptível a infecções, incluindo-se as bacterianas (PAPPU *et al*, 2011). Foi observado que a atividade da IL-17 potencializa a ação dos macrófagos murinos aumentando a eliminação da micobactéria (LING *et al*, 2013). Tendo isso em vista, seria esperado que os estímulos aumentassem

a frequência de respondedores à citocina. Mas, além dessa associação não ser uniforme (FAN *et al*, 2012), a presença, concomitante de um grande número de respondedores à IL-10 (97,7% de produtores de IL-10 em resposta ao extrato), apresentaria efeito inibitório sobre a IL-17, sendo, então natural a presença de poucos indivíduos produtores de IL-17 uma vez que, na ausência de IL-10, há aumento na produção de IFN $\gamma$  e IL-17 (PITT *et al*, 2012).

#### 4. Considerações Finais

A maioria dos indivíduos atópicos estavam sensibilizados pelos ácaros. Tanto o PPD quanto o extrato de *M. bovis* induziram alterações nas respostas dos indivíduos às citocinas. As citocinas Th1 e a IL-10 apresentaram grande frequência de respondedores, sendo melhor induzidas do que a IL-5 e IL-17. Mais estudos deverão ser feitos para avaliar o papel das células do sangue total da população em relação à produção das citocinas e também em relação à condição de atopia e de asma. Os demais sobrenadantes de 24h e 120h estimulados com o extrato e com o PPD serão dosados posteriormente.

#### Referências

- AABY, *et al*. Early, BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. **Clinical and Experimental Allergy**. 30, 644-650, 2000
- AGGARWAL, *et al*. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**. 119 (3), 651-665, 2012
- ALCÂNTARA-NEVES, *et al*. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. **BMC Research Notes**. 19 (7), 2014
- ANDERSEN, DOHERTY. The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nature**. 3, 656-662, 2005
- ANNUS, *et al*. Atopic disorders among Estonian schoolchildren in relation to tuberculin reactivity and the age at BCG vaccination. **Allergy**. 59, 1068-1073, 2004
- ASHER, *et al*. ISAAC Phase III study group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet*. 368, 733-752, 2006
- BOEHM, *et al*. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annual Review of Immunology**. 15, 749-795, 1997

- BOER, *et al.* CD39 is involved in mediating suppression by *Mycobacterium bovis* BCG-activated human CD8+CD39+ regulatory T cells. **European Journal of Immunology**. 43, 1925-1932, 2013
- CAVALLO, *et al.* Decrease of specific and total IgE levels in allergic patients after BCG vaccination. **American Medical Association**. 128, 1058-1060, 2002
- CHEN, *et al.* Recombinant MPT83 derived from *Mycobacterium tuberculosis* induces cytokine production and upregulates the function of mouse macrophages through TLR2. **The Journal of Immunology**. 188, 668-677, 2012
- CHEONG, *et al.* Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blot 1 and Derp 1. **Allergy**. 58 (9), 912-920, 2003
- DEMISSIE, *et al.* Study Group. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4 $\delta$ 2. **The Journal of Immunology**. 172, 6938-6943, 2004
- DO, *et al.* Cockroach allergen exposure and risk of asthma. **Allergy**. 2015
- ELLERTSEN, *et al.* Allergic sensitisation in tuberculosis patients at the time of diagnosis and following chemotherapy. **BMC Infectious Diseases**. 2009
- FAN, *et al.* Variation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen- specific IFN- $\gamma$  and IL-17 responses in healthy Tuberculin Skin Test (TST)-positive human subjects. **Plos One**. 7 (8), 2012
- FIGUEIREDO, *et al.* Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 131 (4), 1064-1068, 2013
- GIACOMINI, *et al.* Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **Journal of Immunology**. 166 (12), 7033-7041, 2001
- GRÜBER, *et al.* Delayed hypersensitivity to tuberculin, total immunoglobulin e, specific sensitization, and atopic manifestation in longitudinally followed early bacille calmette-guérin-vaccinated and non-vaccinated children. **Pediatrics**. 107 (3), 2001
- HEUER, *et al.* The 30-kDa and 38-kDa antigens from *Mycobacterium tuberculosis* induce partial maturation of human dendritic cells shifting CD4+ T cell responses towards IL-4 production. **BMC Immunology**. 14 (48), 2013
- HEUTS, *et al.* CD4+ cell-dependent granuloma formation in humanized mice infected with mycobacteria. **PNAS**, 110 (16), 6482-6487, 2013
- KLUG-MICU, *et al.* CD40 ligand and interferon- $\gamma$  induce an antimicrobial response against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes. **Immunology**. 139 (1), 121-128, 2013
- LIN, *et al.* Tumor Necrosis Factor and Tuberculosis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. 12, 22-25, 2007
- LING, *et al.* A role for interleukin-17A in modulating intracellular survival of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in murine macrophages. **Immunology**. 140, 323-334, 2013

- MARTIGNON, *et al.* Does childhood immunization against infectious diseases protect from the development of atopic disease? **Pediatric Allergy and Immunology**. 16, 193-200, 2005
- OBIHARA, *et al.* Inverse association between *Mycobacterium tuberculosis* infection and atopic rhinitis in children. **Allergy**. 60, 1121-1125, 2005
- OVCHINNIKOVA, *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG killed by extended freeze-drying induces an immunoregulatory profile and protects against atherosclerosis. **Journal of Internal Medicine**. 275 (1), 49-58, 2014
- PAI, *et al.* Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**. 27 (1), 3-20, 2014
- PAPADOPOULOS, *et al.* Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA. **Clinical and Translational Allergy**. 2 (21), 2012
- PAPPU, *et al.* The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. **Immunology**. 134, 8-16, 2011
- PARISH, WHEELER. Preparation of cell-free extracts from *Mycobacteria*. **Methods in Molecular Biology**. 101, 77-89, 1998
- PARK, *et al.* The association of BCG vaccination with atopy and asthma in adults. **International Journal of Medical Sciences**. 12 (8), 668-673, 2015
- PITT, *et al.* Blockade of IL-10 signaling during BCG vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Immunology**. 189 (8), 4079-4087, 2012
- QUIAO, *et al.* ESAT-6- and CFP-10-specific Th1, Th22 and Th17 cells in tuberculous pleurisy may contribute to the local immune response against *Mycobacterium Tuberculosis* infection. **Clinical Immunology**. 73, 330-337, 2011
- ROOK, *et al.* Microbial “old friends”, immunoregulation and stress resilience. **Evolution, Medicine, and Public Health**. 46-64, 2013
- SMITH, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* PPD-induced immune biomarkers measurable *in vitro* following BCG vaccination of UK adolescents by multiplex bead array and intracellular cytokine staining. **BMC Immunology**. 11, 1-11, 2010
- SMITH. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical Microbiology**. 16 (3), 463-496, 2003
- SOLÉ, *et al.* A asma na criança e no adolescente brasileiro: contribuição do International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo, 32(1), 114-125, 2013
- SOLÉ, *et al.* Changes in the prevalence of asthma and allergic diseases among brazilian schoolchildren (13–14 years old): comparison between isaac phases one and three. **Journal of Tropical Pediatrics**. 53(1), 13-21, 2006
- STRACHAN. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. **Thorax**. 55, S2-S10, 2000



STRACHAN. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**. 299, 1259-1260, 1989

SZPAKOWSKI, *et al.* Dendritic cell activity driven by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing human IL-18, in healthy BCG vaccinated adults. **Journal of Immunology Research**. 2014

UPADHYAYA, *et al.* Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells. **The Journal of Immunology**. 187, 3111-3120, 2011

VALKONEN, *et al.* Bacteria exposures and associations with atopy and asthma children. **PLoS One**. 10 (6), 1-14, 2015

VAN MEIJGAARDEN, *et al.* Human CD8+ T-cells Recognizing Peptides from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) Presented by HLA-E Have an Unorthodox Th2-like, Multifunctional, Mtb Inhibitory Phenotype and Represent a Novel Human Tcell Subset. **PLOS**. 1-24, 2015

WOUNDE, *et al.* Differential detergent extraction of *Mycobacterium marinum* cell envelope proteins identifies an extensively modified threonine-rich outer membrane protein with channel activity. **Journal of Bacteriology**. 195 (9), 2050-2059, 2013

YAP, *et al.* Multiple house dust mite allergen-sensitization profiles in children with allergic asthma. **Journal of Allergy and Therapy**. 5 (3), 2014

Tabela 1: Citocinas produzidas por células do sangue total de 55 indivíduos estimuladas ou não pelo extrato de *Mycobacterium bovis*

Citocina	Células não estimuladas	Respostas das células estimuladas com extrato de <i>M. bovis</i>		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 53</b>			
	Respondedor	22 (41,5)	7 (13,2)	<b>0,045</b>
	Não Respondedor	11 (20,8)	13 (24,5)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 53</b>			
	Respondedor	44 (83,0)	9 (17,0)	**
	Não Respondedor	--	--	
IL-10	<b>Total: 43</b>			
	Respondedor	38 (88,4)	0 (0,5)	0,116
	Não Respondedor	4 (9,3)	1 (2,3)	
IL-5	<b>Total: 52</b>			
	Respondedor	11 (20,8)	0 (0,5)	<b>0,001</b>
	Não Respondedor	3 (5,7)	39 (73,6)	
IL-13	<b>Total: 54</b>			
	Respondedor	17 (38,6)	2 (4,5)	<b>0,001</b>
	Não Respondedor	10 (22,7)	15 (34,1)	
IL-17	<b>Total: 54</b>			
	Respondedor	17 (32,1)	0 (0,5)	<b>0,001</b>
	Não Respondedor	9 (17,0)	27 (50,9)	

\*Teste exato de Fisher; \*\*valor de p não calculado; valores em negrito são estatisticamente significantes.

Tabela 2: Citocinas produzidas por células do sangue total de 21 indivíduos estimuladas ou não pelo PPD

Citocina	Células não estimuladas	Resposta ao estímulo do PPD		*Valor de p
		Sim (%)	Não (%)	
IFN $\gamma$	<b>Total: 21</b>			
	Respondedor	6 (28,6)	5 (23,8)	0,659
	Não Respondedor	7 (33,3)	3 (14,3)	
TNF $\alpha$	<b>Total: 21</b>			
	Respondedor	14 (66,7)	7 (33,3)	**
	Não Respondedor	--	--	
IL-10	<b>Total: 20</b>			
	Respondedor	9 (45,0)	10 (50,0)	0,500
	Não Respondedor	1 (5,0)	0 (0,5)	
IL-5	<b>Total: 20</b>			
	Respondedor	4 (20,0)	0 (0,5)	<b>0,003</b>
	Não Respondedor	2 (10,0)	14 (70,0)	
IL-13	<b>Total: 20</b>			
	Respondedor	9 (45,0)	1 (5,0)	<b>0,020</b>
	Não Respondedor	3 (15,0)	7 (35,0)	
IL-17	<b>Total: 21</b>			
	Respondedor	5 (23,8)	1 (4,8)	<b>0,014</b>
	Não Respondedor	3 (14,3)	12 (57,1)	

\*Teste exato de Fisher; \*\*valor de p não calculado; valores em negrito são estatisticamente significantes.

## ANEXO I: Comprovante da Aprovação do Conselho de Ética

INSTITUTO DE SAÚDE  
COLETIVA / UFBA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Fatores de risco para persistência, aquisição e remissão de sintomas de asma e marcadores de alergia em crianças na cidade de Salvador: Coorte SCAALA

**Pesquisador:** Mauricio Lima Barreto

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 07017212.6.0000.5030

**Instituição Proponente:** Instituto de Saúde Coletiva / UFBA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 120.616

**Data da Relatoria:** 25/09/2012

#### Apresentação do Projeto:

**Título do Projeto:** Fatores de risco para persistência, aquisição e remissão de sintomas de asma e marcadores de alergia em crianças na cidade de Salvador: Coorte SCAALA

**Pesquisador Responsável:** prof. Mauricio Lima Barreto-Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Bahia

#### Nome dos pesquisadores--Instituições

##### Coordenador

Álvaro Cruz - Centro de Enfermidades Respiratórias, HUPES - Faculdade de Medicina da UFBA

Darci Neve dos Santos - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia

Neuza Maria Alcântara Neves-Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

Laura Cunha Rodrigues - London School of Hygiene and Tropical Medicine, Inglaterra

Lain Pontes de Carvalho - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Bahia

Bemd Genser - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia

Registro CEP/ISC 060-12 em 23/08/2012

Endereço: Rua Basílio da Gama s/n

Bairro: Canela

CEP: 40.110-040

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7441

Fax: (71)3283-7460

E-mail: cepisc@ufba.br

**Objetivo da Pesquisa:**

O projeto tem como Objetivos principais: \_ Explorar o efeito de exposições passadas e presentes na aquisição, persistência e remissão de sintomas de asma em crianças da coorte SCAALA - Salvador; \_ Explorar o efeito de exposições passadas e presentes nos marcadores de alergia em crianças da coorte SCAALA - Salvador; \_ Explorar os possíveis mecanismos imunológicos relacionados a esses desfechos; e Objetivos específicos: \_ Identificar os fatores de risco relacionados ao surgimento de sintomas de asma durante o seguimento da coorte SCAALA Salvador; \_ Identificar os fatores de risco relacionados à remissão dos sintomas de asma durante o seguimento da coorte de crianças identificadas como asmáticas em 2005; \_ Identificar os fatores de risco relacionados à persistência de sintomas de asma durante o seguimento da coorte de crianças identificadas como asmáticas em 2005; \_ Identificar os fatores de risco relacionados à mudança de status dos marcadores de alergia durante o seguimento da coorte SCAALA Salvador.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Em relação aos riscos e benefícios, informa que o único risco que poderá advir são os decorrentes da venopunção para coleta de sangue, porém, que são mínimos, porque o procedimento será efetuado por pessoal adequadamente treinado e capacitado para realização da tarefa. Em contrapartida, o principal benefício será de acrescentar informações para o entendimento e refinamento das estimativas de associações com a causalidade da incidência de asma e doenças alérgicas e fatores precipitantes de seus episódios e severidade na população de Salvador), podendo subsidiar medidas de prevenção. De forma direta estão previstos: 1) diagnóstico e orientação terapêutica para asma severa por pessoal especializado; 2) diagnóstico e orientação terapêutica de desnutrição e obesidade provido pelo projeto; e 3) orientação dietética nos casos de desnutrição grave.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo longitudinal, interdisciplinar, multi-institucional, envolvendo instituição estrangeira no processo de análise que acompanhará 1.445 crianças e adolescentes da coorte SCAALA (Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America) - Salvador, seguidas desde 1998. Sobre esta coorte já foram realizados 3 inquéritos, sendo este o 4º inquérito. A coleta de dados do seguimento será realizada através de uma visita domiciliar. Propõe-se a realização de um Inquérito IV (2012), no qual poderão ser identificados os fatores associados à incidência de sintomas de asma, à gravidade da doença nas crianças com sintomas persistentes (utilizando uma versão adaptada do ISAAC-The International Study on Asthma and Allergies in Childhood, fase III), assim como será possível investigar marcadores de alergia e, mais profundamente, os mecanismos imunológicos relacionados a esses desfechos. Este inquérito será constituído por 3 diferentes componentes que se aplicarão à toda população de estudo: 1) aplicação do questionário para

Endereço: Rua Basílio da Gama s/n  
Bairro: Canela CEP: 40.110-040  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3283-7441 Fax: (71)3283-7460 E-mail: cepisc@ufba.br

obtenção de dados referentes aos sinais e sintomas de asma e seus fatores de risco; 2) exame sorológico para determinação dos indivíduos atópicos através dos níveis séricos de IgE Total e específico; e 3) medição de peso e altura.

A seleção das crianças foi realizada a partir da divisão da cidade de Salvador em 1.765 setores censitários (Censo 1991) tendo estes setores sido classificados em 8 categorias de acordo com o nível de esgotamento sanitário e salário mínimo. Estes setores foram posteriormente agregados em função da estimativa da população com idade de 0-4 anos, resultando em 1.100 agregados denominados "microáreas". A população do inquérito I foi formada por 23 destes agregados, selecionados por conveniência entre as diferentes bacias de esgotamento sanitário da cidade de Salvador.

As amostras biológicas serão armazenadas e analisadas no Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA) e as análises dos dados realizadas por um equipe multidisciplinar composta por profissionais médicos, epidemiologistas, imunologistas, geneticistas, estatísticos, psicólogos e estudantes de pós-graduação, tendo como sede principal o Instituto de Saúde Coletiva (ISC), em colaboração com a Faculdade de Medicina (FAMED), o Instituto de Matemática, o ProAr (Programa para o controle da asma e da rinite alérgica na Bahia) e a London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM/UK).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O protocolo de pesquisa apresenta todos os itens necessários à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa: folha de rosto, descrição da pesquisa, informação relativa aos sujeitos da pesquisa e curriculum vitae dos pesquisadores.

Os responsáveis pelos participantes na coorte serão convidados mediante convite e termo de consentimento livre e esclarecido que informa sobre o conteúdo da pesquisa e seus riscos e benefícios, possibilitando a participação de forma voluntária, assegurando o sigilo nominal, a confidencialidade das informações e o direito de não ter a obrigatoriedade a participar da mesma.

Foram explicitadas as responsabilidades do pesquisador, das instituições participantes e patrocinador, bem como informações quanto ao uso e armazenamento do material biológico, assegurando-se o uso exclusivo para o projeto.

Foram apresentados Termo de compromisso de submissão do protocolo de novas pesquisas com o material oriundo do presente estudo ao CEP Institucional e ao CONEP, além de cronograma de execução e orçamento discriminando fontes e aplicação dos recursos.

Assim, pelo exposto, considero não haver qualquer observação que contra-indique a sugestão de

Endereço: Rua Basílio da Gama s/n  
Bairro: Canela CEP: 40.110-040  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3283-7441 Fax: (71)3283-7460 E-mail: cepisc@ufba.br